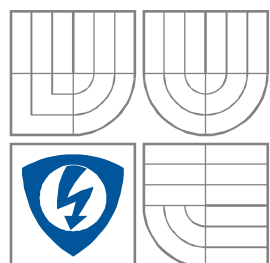


**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**  
**BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY**



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ**

**ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**

**FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION**

**DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING**

## **MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO NAPĚTÍ POMOCÍ NAPĚŤOVĚ CITLIVÝCH BARVIV**

MEMBRANE POTENTIAL MEASUREMENT WITH VOLTAGE SENSITIVE DYES IN CONFOCAL  
MICROSCOPY

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**  
**MASTER'S THESIS**

**AUTOR PRÁCE**

**Bc. MONIKA HECZKOVÁ**

**AUTHOR**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

**Ing. VRATISLAV ČMIEL**

**SUPERVISOR**

**BRNO 2013**



**VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky  
A komunikačních technologií**

**Ústav biomedicínského  
inženýrství**

## **Diplomová práce**

magisterský navazující studijní obor

### **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

**Studentka:** Bc. Monika Heczková  
**Ročník:** 2

**ID:**120313  
**Akademický rok:** 2012/2013

**NÁZEV TÉMATU:**

### **Měření membránového napětí pomocí napětově citlivých barviv**

#### **POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:**

1) Seznamte se s napětově citlivými barvivy a metodami fluorescenční a konfokální mikroskopie pro měření změn membránového napětí. Zabývejte se oblastí buněčné elektrofyzologie. Sestavte literární rešerši. 2) Vyberte vhodnou metodu měření membránového napětí s využitím napětově citlivých sond. 3) Navrhněte postup měření membránového napětí na dostupných volných buňkách s využitím napětově citlivých barviv DI-4-ANEPPS a RH-237 s pomocí konfokálního mikroskopu. 4) Realizujte měření na navrženém systému s pomocí obou sond. Pořídte záznamy a proveďte kvantitativní vyhodnocení. 5) Proveďte srovnání vlastností obou sond zejména z hlediska účinnosti měření membránového napětí. 6) Proveďte diskusi k získaným výsledkům.

#### **DOPORUČENÁ LITERATURA:**

- [1] LAKOWICZ, J. R. Principles in Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York 1993.
- [2] GONZALES, R. C. Digital Image Processing, 2007. ISBN-13: 978-0131687288.

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 24.5.2013

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel  
Konzultanti diplomové práce:

prof Ing. Ivo Provazník, Ph.D.  
Předseda oborové rady

#### **UPOZORNENÍ:**

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona c. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku c.40/2009 Sb.

## **Abstrakt**

Cílem této práce je sestavit literární rešerši v oblasti měření membránového napětí pomocí napětově citlivých barviv a navrhnout postup měření membránového napětí na dostupných buňkách s využitím napětově citlivého barviva Di-4-ANEPPS a RH237. Práce obsahuje úvod do elektrofyzologie živočišných buněk, vysvětluje fluorescenci a její typické vlastnosti a věnuje se popisu fluorescenčního mikroskopu. Dokument se z velké části věnuje charakterizaci a rozdělení napětově citlivých barviv. Výstupem práce je návrh řešení reálného experimentu.

## **Klíčová slova**

Buněčná membrána, membránový potenciál, fluorescence, fluorescenční mikroskopie, napětově citlivá barviva, rychle reagující sondy, Di-4-ANEPPS, RH237.

## **Abstract**

The aim of this work is to make a literature search in the measurement of membrane voltage using the voltage-sensitive dyes and suggest a method of measuring the membrane voltage on the available cells using the voltage-sensitive dye Di-4-ANEPPS and RH237. The work contains an introduction to electrophysiology of cell, explains fluorescence and typical fluorescence characteristics. The thesis contains the description of a fluorescence microscope. The document was largely devoted to characterization and distribution of voltage-sensitive dyes. The output of a design solution is a real experiment.

## **Keywords**

Cell membrane, membrane potencial, fluorescence, fluorescence microscopy, voltage-sensitive dyes, fast response probes, Di-4-ANEPPS, RH237.

## **Bibliografická citace**

HECZKOVÁ, M. *Měření membránového napětí pomocí napětově citlivých barviv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 48 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Vratislav Čmiel.

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Měření membránového napětí pomocí napěťově citlivých barviv jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 24. 5.2013

.....  
podpis autorky

## Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Vratislavu Čmielovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne 24. 5.2013

.....  
podpis autorky

## Obsah

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Úvod .....  | 2  |
| 2     | Buňka.....  | 3  |
| 2.1   | Membránový potenciál .....  | 3  |
| 2.2   | Klidový membránový potenciál .....  | 4  |
| 3     | Luminiscence .....  | 6  |
| 3.1   | Fluorescence .....  | 6  |
| 3.2   | Fosforescence .....   | 8  |
| 3.3   | Zákon zrcadlové symetrie spekter .....                                    | 8  |
| 3.4   | Stokesův posuv .....  | 9  |
| 4     | Fluorescenční mikroskopie.....  | 10 |
| 5     | Rozdělení fluoroforů .....  | 13 |
| 5.1   | Fluorescenční značky .....  | 13 |
| 5.2   | Fluorescenční barviva .....   | 14 |
| 5.3   | Napětově citlivá fluorescenční barviva.....                               | 15 |
| 5.3.1 | Di-4-ANEPPS .....   | 18 |
| 5.3.2 | RH 237 .....  | 19 |
| 6.    | Experimentální část .....   | 21 |
| 6.1   | Popis experimentu.....  | 21 |
| 6.2   | Příprava buněčného vzorku .....   | 23 |
| 6.3   | Měření na konfokálním mikroskopu .....                                    | 23 |
| 6.4   | Elektrodový systém.....   | 26 |
| 6.4.1 | Měření s použitým elektrodovým systémem.....                              | 28 |
| 6.5   | Změna napětí na membráně buňky výměnou externího fyziologického roztoku.. | 37 |
| 7     | Závěr .....   | 41 |
| 8     | Použitá literatura.....   | 43 |
| 9     | Seznam obrázků .....  | 46 |
| 10    | Seznam tabulek.....   | 48 |

# 1 Úvod

Studium elektrofyzologie buněk je v dnešní době nedílnou součástí mnoha biologických výzkumů. Důvodem je, že elektrické signály hrají důležitou roli při řízení a funkci celého organismu. Tyto elektrické signály zajišťují přenos dat a řídí činnost mnoha orgánů. Tato semestrální práce se věnuje měření membránového potenciálu pomocí napětově citlivých barviv. Elektrické měření vlastností buněk a následná kvantitativní analýza naměřených dat je důležitým prvkem pro řadu odvětví. Uplatňují se v biomedicínských oborech, ale jsou důležité také pro klinické diagnostické metody nebo pro výzkum a vývoj léků.

Prvotním cílem této diplomové práce bylo sestavit literární rešerši v oblasti měření membránového napětí na dostupných buňkách s využitím napětově citlivého barviva Di-4-ANEPPS a RH237. K uvedení do problematiky bylo třeba nastudovat základní poznatky elektrofyzologie buňky. Práce se tedy v první části zabývá popisem buněčné membrány a membránovým potenciálem buňky. V další kapitole podrobně rozebírá princip fluorescence a její typické vlastnosti. Práce seznamuje se základy fluorescenční mikroskopie. Provádí se srovnání mezi klasickým fluorescenčním mikroskopem a konfokálním fluorescenčním mikroskopem. V odborných článcích bylo potřeba dohledat informace pojednávající o fluoroforech a o jejich základních rozděleních. Tato práce se zaměřuje především na napětově citlivá fluorescenční barviva. Tato barviva můžeme rozdělit na dvě základní skupiny, a to na fluorescenční barviva s rychlou a pomalou odezvou na změny napětí.

V dalších kapitolách se můžeme setkat s navržením a s realizací postupu měření membránového napětí na buňkách myších fibroblastů s pomocí obou fluorescenčních barviv.

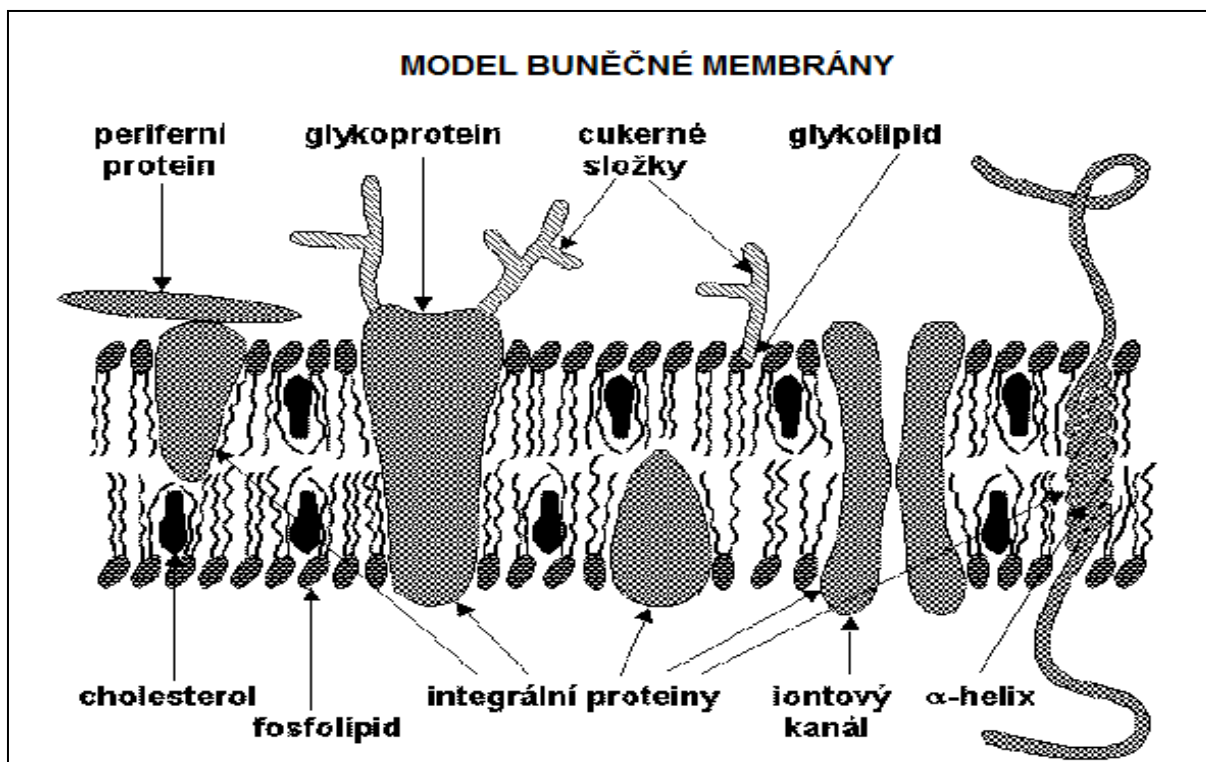
## 2 Buňka

Buňka je nejmenší znám útvar, který je schopný všech životních projevů. K tomu je potřeba základních komponent, které sdílí většina buněk. Na přenosu genetické informace se podílí kyselina deoxyribonukleová a enzymový aparát, pro přeměnu látek a zpracování živin se uplatňuje metabolický aparát a plazmatická membrána, která odděluje vnitřní prostředí buňky od extracelulárního prostředí.

### 2.1 Membránový potenciál

Na povrchu buněk je buněčná membrána (cytoplazmatická membrána, biomembrána). Biomembrány regulují přechod látek z okolí do buněk a naopak. Je tvořena z molekul bílkovin a proteinů a v malém množství také ze sacharidů. Základem struktury je fosfolipidová dvojvrstava (tvoří ji fosfolipidy, glykolipidy, cholesterol), která je tvořená hydrofilní částí membrány a vnitřní hydrofobní částí (Obr.1). Do této membrány jsou zabudovány integrální a periferní proteiny, které plní různé funkce. Z hlediska elektrofyziologie nás zajímají elektrochemické pochody v buňce, které nám přibližují bioelektrické jevy buňky. Téměř každá buňka a zřejmě i všechny membránou uzavřené orgány vykazují různou velikost elektrického pole uvnitř a vně, což vytváří membránový potenciál. Vnitřní prostředí buňky představuje záporný náboj, vnější část buňky má náboj opačný. Pro popis potenciálu na membráně budeme uvažovat pouze jednoduchý model buňky, zahrnující elektricky nevodivou membránu na povrchu buňky a dále vnější (extracelulární) a vnitřní (intracelulární) prostředí. Hlavní anorganické ionty obsažené v obou prostředích jsou *kationty*  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a *aniont*  $Cl^-$ . Ve vnitřním prostředí se uplatní navíc organické anionty. Z hlediska vedení elektrického proudu se jedná o elektrolyty. Membránové napětí je rozdílem mezi elektrickými potenciály intracelulárního a extracelulárního prostředí ( $U_m = \varphi_i - \varphi_e$ ). [1][2][6]





Obrázek 1: Model buněčné membrány. [6]

## 2.2 Klidový membránový potenciál

Základní elektrickou vlastností je klidový membránový potenciál, a na jeho rychlých (ms) a pomalých (s) změnách je založena komunikace mezi vzrušivými buňkami. Abychom pochopili klidový membránový potenciál představme si situaci, že buněčná membrána je tvořena pouze fosfolipidovou dvojvrstvou, která je fyziologicky nepropustná pro veškeré ionty. Intracelulární a extracelulární prostředí je elektroneutrální. Pokud ovšem bude membrána selektivně propustná pro stále otevřené kanály pro ionty  $K^+$ , budou se tyto kanály účastnit elektrochemických dějů. V jednom okamžiku na tyto ionty budou působit dvě síly. Chemická síla, kdy na základě difuze budou  $K^+$  ionty mířit na základě koncentračního spádu z prostředí o větší koncentraci do místa o koncentraci nižší. A síla elektrická, kdy se přesunem kladného náboje naruší elektrická rovnováha buňky a na membráně se vytvoří elektrické pole, které pohání ionty podle jejich polaritý na základě elektrického gradientu. Celková koncentrace pozitivních a negativních iontů je všude nulová. V okamžiku, kdy se působení elektrického a koncentračního gradientu vyrovná, pak dojde k ustavení dynamické rovnováhy - tj. intracelulárně se přesune přesně stejný počet určitých iontů jako extracelulárně. Membránový potenciál, při němž se dynamická rovnováha ustanoví

označujeme jako elektrochemický rovnovážný potenciál. Jeho hodnotu lze vypočítat pomocí Nernstovy rovnice, obecně ji můžeme napsat ve tvaru:

$$U_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X^z]_e}{[X^z]_i} \quad (1)$$

Kde R je plynová konstanta ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), T absolutní teplota a F Faradayův náboj ( $96\,485 \text{ C mol}^{-1}$ ), z je počet elementárních nábojů, e, i – extracelulární a intracelulární prostředí.

[1][2][3][4]

Akční potenciál vzniká podrážděním vzrušivé buňky. K přechodné změně membránového potenciálu dochází zejména na buněčné membráně neuronů a svalových buněk. Příčinou této náhlé změny je otevření sodíkových kanálů, což má za následek rychlé vtékání sodíkových iontů ( $\text{Na}^+$ ) dovnitř buňky po koncentračním spádu. Akční potenciál je popsán dvěma fázemi. Fáze, kdy membránový potenciál stoupá ke kladným hodnotám se nazývá depolarizace. Repolarizace je opačný jev, kdy se membrána opět stává znovu propustnější pro  $\text{K}^+$  ionty a membránový potenciál se začíná vracet na svou klidovou hodnotu.

[2][5][6]

### 3 Luminiscence

Jev, který způsobuje emisi světla u molekul a atomů, které jsou uvedeny do excitovaného stavu, vytvořeného fyzickým (absorpce světla), mechanickým nebo chemickým mechanismem se nazývá luminiscence. Na základě rozdílné povahy absorbované energie lze luminiscenci rozdělit do několika kategorií. Fotoluminiscence vzniká absorpcí ultrafialového záření nebo fotony viditelného světla. Zdrojem energie pro vznik elektroluminiscence je elektrický proud. Aplikací tepla můžeme vyvolat termoluminiscenci. Triboluminiscence je způsobena mechanickou silou. Chemiluminiscence a bioluminiscence využívá chemických a biochemických reakcí za přítomnosti specifických enzymů. [7][10]

Fotoluminiscence je formálně rozdělena do dvou kategorií, fluorescence a fosforescence. Tyto dva pojmy rozlišujeme v závislosti na excitovaném stavu a emisní dráze. Fosforescence přetrvává po jistou dobu po excitaci světelným zářením, zatímco fluorescence trvá jen po dobu ozáření, řádově od  $10^{-6}$  s do  $10^{-9}$  s. [8][11]

#### 3.1 Fluorescence

Už během 17. a 18. století několik pozorovatelů popsalo luminiscenční jev. Ale teprve britský vědec George Gabriel Stokes v roce 1852 jako první zmínil termín fluorescence v jeho práci. Název fluorescence byl odvozen z názvu minerálu fluoritu (fluorid vápenatý), který emitoval modrou fluorescenci. Svými pokusy potvrdil, že po absorpci světla a nižší vlnové délce dochází k emisi světla o vyšší vlnové délce. Tento rozdíl dnes nazýváme Stokesův posun. V optické mikroskopii se s fluorescencí poprvé setkáváme v rané fázi 20. století, kdy vědci August Köhler a Carl Reichert pozorovali fluorescenci jako vedlejší jev v ultrafialové mikroskopii. První fluorescenční mikroskopy byly vyvinuty v letech 1911 a 1913 německými fyziky Otto Heimstädem a Heinrich Lehmannem. Tyto mikroskopy byly objeveny pro pozorování autofluorescence u bakterií, a také u živočišných, a rostlinných tkání. Krátce poté, Stanislav Von Provázek zahájila novou éru, kdy byla fluorescenční mikroskopie využívána pro studium barviv vázaných v pevných tkáních a v živých buňkách. V roce 1940 Albert Coons vyvinul techniku pro označování protilátek pomocí fluorescenčních barviv, a tak dal za vznik oblasti imunofluorescence. Na přelomu 21. století se fluorescenční mikroskopie stala neodbytnou součástí buněčné biologie pro zobrazování jednotlivých organel a

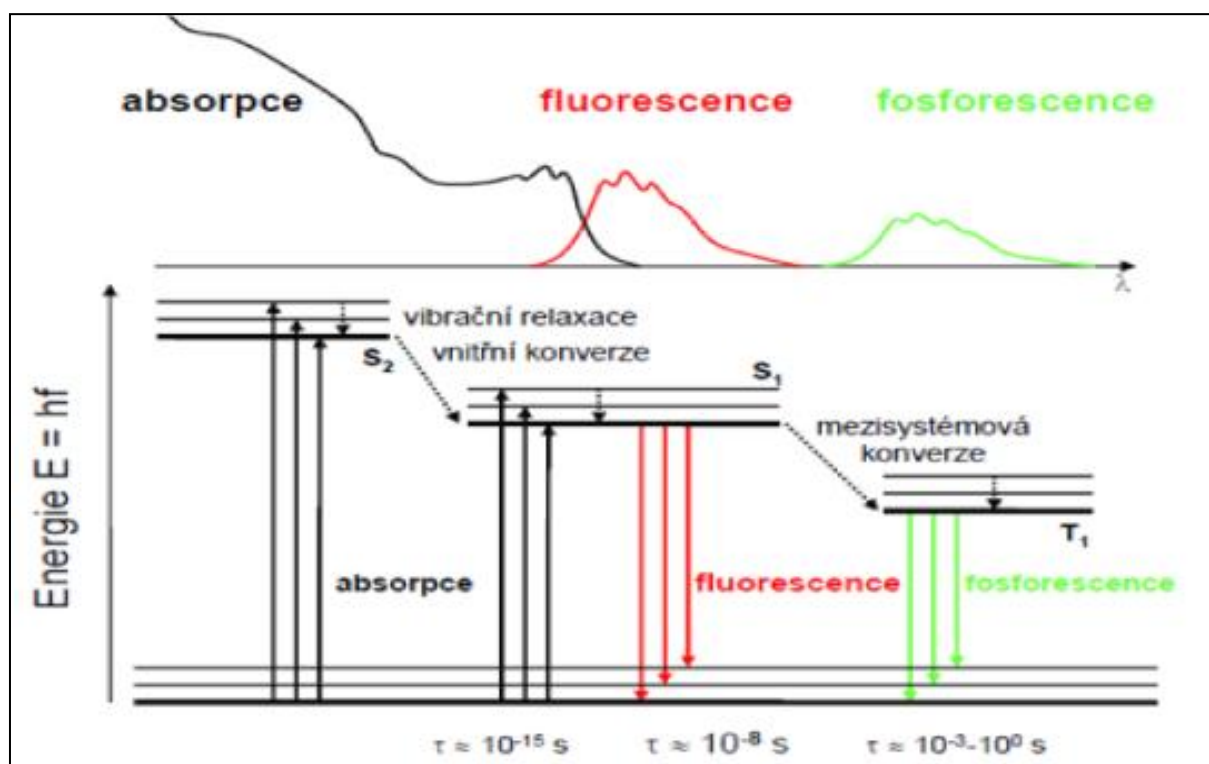
makromolekulárních komplexů se synteticky a geneticky zakódovanými fluorescenčními sondami. [7][8][9]

Atomy se nacházejí buď v základním energetickém stavu nebo ve stavu excitovaném. V základním stavu většinou obsazují vždy dva elektrony stejný elektronový stav s opačným spinem, tento stav se nazývá singletní (S). Po excitaci elektronu na vyšší elektronovou hladinu, již nejsou tyto dvojice elektronů zpárovány a jejich celkový spin je stejný. Tento stav je označován jako tripletní (T). V důsledku vibračního pohybu molekul, je každý elektronový stav tvořen několika vibračními hladinami. Po absorpci fotonu dojde k excitaci z vibračního stavu na základní elektronové hladině na jednu z mnoha hladin v elektronovém excitovaném stavu. Molekula na vysoké vibrační hladině velmi rychle ztrácí energii při kontaktu s okolními molekulami a přechází zpět na nižší vibrační hladinu. Tento přechod do postupně nižších excitovaných stavů je popsán tzv. nezářivými přechody (vnitřní konverze a mezisystémový přechod) a vibrační relaxací. Obecně se vyskytuje v pikosekundách a méně. Fluorescence se projeví nastane-li přechod ze základní vibrační hladiny excitovaného stavu do základního stavu za současného uvolnění(emise) fotonu. Vybuzená molekula setrvá v nejnižším singletovém stavu v řádech nanosekund, předtím než se dostane zpět do stavu základního. Při ozařování s širokým spektrem vlnových délek bude generována celá řada přechodů mezi vibračními energetickými hladinami excitovaných stavů. Některé z nich budou mít mnohem vyšší stupeň pravděpodobnosti, než ostatní. Společně budou představovat absorpční spektrum molekuly. Vzhledem k tomu, že molekula před emisí fotonu fluorescenčního záření ztratí část energie dodané fotonem excitačního záření, je vlnová délka fluorescenčního záření větší, než vlnová délka excitačního záření. Zářivé a nezářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy molekuly jsou popsány Jablonského diagramem (Obr.2).

[8][9][11]

## 3.2 Fosforescence

Většinou až z hladiny  $S_1$  se případně uplatní i nežářivý mezisystémový přechod do některého z tripletních stavů. Žářivý přechod ze základní vibrační hladiny nejnižšího tripletního stavu  $T_1$  do základního stavu  $S_0$  má dlouhou dobu dosvitu řádu  $10^{-3}$  s až  $10^{-1}$  s a je označován jako fosforescence. [7]



Obrázek 2: Jablonského diagram. Žářivé a nežářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy molekuly. [8]

## 3.3 Zákon zrcadlové symetrie spekter

Excitační a emisní spektra jsou charakteristické pro látky vykazující fluorescenci (fluorochromy). V podstatě tato spektra popisují intenzitu fluorescence v závislosti na vlnové délce. Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na excitační vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření. V podstatě je to pásmo vlnových délek, které je schopno excitovat molekuly nebo atomy vykazující fluorescenci.

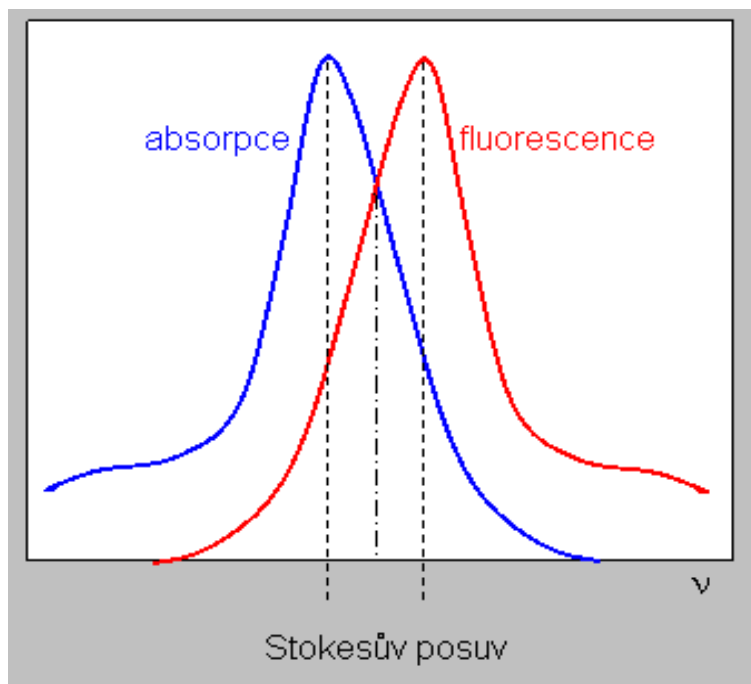
Spektrum vlnových délek, které jsou emitovány z atomu nebo molekuly poté, co byly excitovány fotonem viditelného světla, se nazývá emisní. Můžeme ho popsat jako závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní excitační vlnové délce. Obvykle je fluorescenční emisní spektrum, které je zobrazeno jako závislost intenzity na vlnové délce,

umístěné v oblasti delších vlnových délek než stimulující budící (excitační) spektrum. Vlnová délka emise je delší než vlnová délka excitace.. Tvar emisního spektra je nezávislý na vlnové délce excitace. Jelikož vlnová délka udává barvu světla, pozorujeme u emitovaného světla posun k červené části spektra. [8][10][12]

Zrcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem platí pro velké množství organických molekul a je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu. Po absorpci přechází elektron z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_0$  na vyšší vibrační hladinu stavu  $S_1$ , poté dochází k rychlé vibrační relaxaci na vibrační hladinu excitovaného stavu  $S_1$  a poté následuje zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu stavu  $S_0$ . [10]

### 3.4 Stokesův posuv

Vlnová délka emitovaného světla je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla. To je dáno tím, že po absorpci záření často dochází k částečné ztrátě energie při přechodu z vyšších excitovaných elektronových stavů do metastabilního nejnižšího excitovaného stavu. Rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká Stokesův posuv (Obr.3). [6]



Obrázek 3: Stokesův posuv.[10]

## 4 Fluorescenční mikroskopie

Použití konvenčního fluorescenčního mikroskopu při studiu biologických struktur je často limitováno jednak tloušťkou pozorovaného objektu, jednak skutečností, že výsledný obraz je do jisté míry tvořen světlem emitovaným z fokální roviny i vrstev, nalézajících se nad a pod rovinou zaostření. To přispívá k více či méně k šumu v obrazu a identifikace jemných struktur ve vzorku je pak obtížná. Naproti tomu, konfokální mikroskopie umožňuje získání obrazu z jediné definované fokální roviny. Struktury ležící mimo tuto rovinu se nezobrazí. Navíc je možno získat řadu po sobě následujících konfokálních obrazů z předem definovaných fokálních rovin. [7][9]

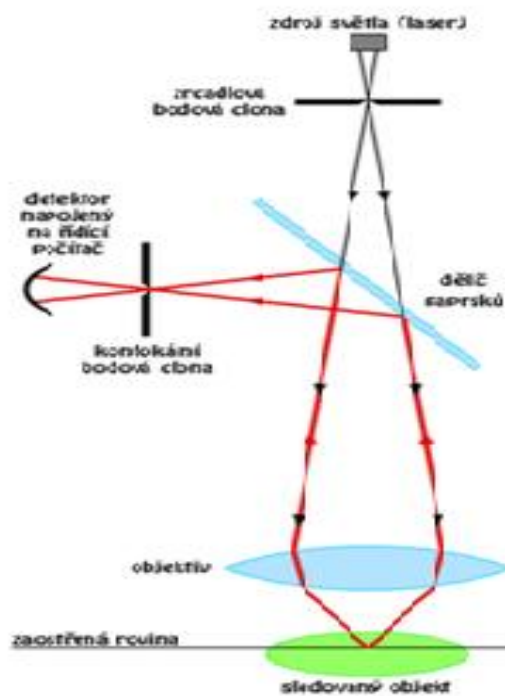
Ve fluorescenčním mikroskopu je zdrojem světla rtuťová výbojka, její světlo dopadá na excitační filtr, který dále propouští z barevného spektra pouze část potřebnou pro excitaci fluorescence a zabraňuje průchodu paprsků světla o stejné či podobné vlnové délce jako světlo emisní, které by vytvářelo pozadí. Paprsky se dále odráží od polopropustného dichroického zrcátka. To propouští a odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. Používá se tedy vždy takový typ zrcadla, který maximum excitačního světla odráží a maximum emisního světla propouští. Dále světlo prochází objektivem k preparátu, kde dochází k excitaci fluoroforem. Paprsky prošlé dichromatickým zrcadlem a bariérovým filtrem můžeme pozorovat. Bariérový filtr propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačnímu světlu, čímž poskytuje černé pozadí k fluorescenčnímu obrazu.

Konfokální mikroskop umožňuje odstranit z obrazu objektu šum, který vytváří světlo nebo fluorescence emitovaná z těch rovin vzorku, na které není zaostřena optika. V konfokálním mikroskopu je zdrojem excitačního světla laser, jeho paprsek se po odražení dichromatickým zrcadlem v daném okamžiku soustředí objektivem do jednoho bodu vzorku (fokální bod - FP). Paprsky emitované z tohoto bodu jsou pak snímány detektorem. Aby dopadly na detektor, musí opět projít úzkou štěrbinou, která leží v místě, kam objektiv zaměřuje světlo ze zaostřeného bodu objektu. V konstrukci mikroskopu je dále umístěna clona s velmi malým otvorem (desítky  $\mu\text{m}$ ) v konfokálním bodu. Tato clona nepropustí žádné světlo, které by vycházelo z oblastí jiných, než je fokální bod. Konfokální clona sníží intenzitu světla, proto je světlo registrováno fotonásobičem. Výsledkem je tedy informace o intenzitě světla emitovaného fluoroforem v jediném pixelu fokální roviny preparátu. Tímto způsobem je bod po bodu proskenován celý objekt v různých optických rovinách. Toto skenování je

automatizováno a ovládáno řídicím počítačem. Z nashromážděných informací počítač sestaví celkový obraz (Obr.4). [7][10][11]

Schopnosti konfokálního mikroskopu zobrazovat preparáty s trojrozměrným rozlišením se využívá při studiu povrchových vlastností materiálů. Zkoumá se textura a složení povrchů i eroze materiálů. Konfokálním mikroskopem se vyhodnocují výsledky mikrotestů tvrdosti kovů i plastických materiálů, měří se výška strukturních elementů na polovodičových čipech. Biologie a lékařský výzkum těží ze skutečnosti, že konfokální mikroskopie je ve své podstatě neinvazivní studium prostorové struktury buněk a tkání (Obr.5). Příkladem, může být také studium složité architektury neuronových sítí v mozkové tkáni. Konfokálním mikroskopem lze pomocí výše zmíněných fluorescenčních sond studovat intracelulární koncentrace fyziologicky významných iontů (např.  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), měřit membránový potenciál nebo vnitrobuněčné pH. Imunofluorescenčními metodami, které jsou založeny na přesné chemické specifitě fluorescenčně značených protilátek, se studuje rozložení receptorů v membránách, organizace cytoskeletu, mitotický aparát během dělení, či struktura endoplazmatického retikula. Nevýhodou konfokální mikroskopie je to, že pro získání využitelně silných signálů vyžaduje mimořádně silné zdroje světla typu laserů a speciální technologii detekce fotonů z roviny ostrosti, což se odráží v ceně příslušného vybavení, která se pohybuje v řádech miliónů korun. [9][10][13][18]





Obrázek 4: Princip konfokálního mikroskopu.



Obrázek 5: Konfokální mikroskop.

## 5 Rozdělení fluoroforů

Fluorofory jsou látky, které jsou charakteristické tím, že absorbují záření o vlnové délce UV nebo viditelného záření a následně ho pak emitují o jiné vlnové délce. Fluorofory, které se vyskytují přirozeně nazýváme vlastní. Mezi látky vyznačující se vlastní fluorescencí patří především látky obsahující proteiny, redukované formy nikotinamidadeninukleotid (NADH), nikotinamidadeninukleotid fosfát (NADPH), oxidované formy flavoproteinů, vitamin A, cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin a chlorofyl. V proteinech jsou hlavními fluorofory aromatické aminokyseliny tryptofan (Try), tyrozin (Tyr) a fenylalanin (Phe). Jejich absorpční pás leží mezi 240 nm a 300 nm, emisní pás se pohybuje mezi 280nm až 310nm. Dominantní protein je tryptofan, neboť má mnohem širší emisní spektrum než tyrozin, jehož fluorescenci umožňuje jeho fenolový okruh. Fluorescence tryptofanu je velmi citlivá na vlastnosti jeho okolí a lze ji proto použít pro sledování konformačních změn proteinů (např. při vazbě ligandů nebo při interakcích protein-protein). Mezi častěji používané fluorofory, které se přidávají ke vzorku, jsou fluorofory nevlastní. Pokud se na analyzovaný vzorek váží kovalentně, nazývají se fluorescenční značky, pokud se váží nekovalentně jedná se fluorescenční sondy. [14][15]

### 5.1 Fluorescenční značky

Přidávají se ke studované biomolekule a vážou se na ní kovalentní vazbou. Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové, histidinové boční řetězce nebo thiolové skupiny. Mezi významné fluorescenční značky patří fluoresceinizoithiokynát (FITC) a tetrametylrhodaminizoithiokyanát (TRITC), které se používají v imunofluorescenčních metodách. [14][16]

## 5.2 Fluorescenční barviva

Jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. Iontové fluorofory, jejichž kvantový výtěžek fluorescence a někdy i spektrální vlastnosti se mění po navázání na bílkoviny, membrány nebo nukleové kyseliny se používají pro studium změn konformace bílkovin, tloušťky membrán, membránového potenciálu a viskozity prostředí. Vliv okolního prostředí na emisní vlastnosti takových fluoroforů je dán velkým zvýšením jejich dipólového momentu v excitovaném stavu; během doby života excitovaného stavu potom dochází k reorientaci obklopujících molekul a tím k posuvu fluorescenčního spektra.

Obecně fluorescenční barviva rozdělujeme:

1. Fluorescenční barviva pro polaritu prostředí
2. Fluorescenční barviva pro nukleové kyseliny
3. Membránová fluorescenční barviva
4. Napětově citlivá fluorescenční barviva

Změny membránového potenciálu hrají ústřední roli v mnoha fyziologických procesech (šíření nervových impulsů, ve svalové kontrakci, v buněčné signalizaci, pro posouzení viability buněk). V důsledku nerovnoměrného rozdělení iontů, především  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Cl}^-$  mají buněčné plazmatické membrány transmembránový potenciál kolem -70 mV (negativní je vnitřní část buňky). Depolarizace a hyperpolarizace membrán má klíčovou úlohu v řadě buněčných procesů. Potenciometrické sondy umožňují měření membránového potenciálu v organelách a buňkách, které jsou většinou příliš malé pro zavedení mikroelektrod. Základní vlastností používaných barviv je závislost jejich absorpce a fluorescence na změně membránového napětí. Změny membránového potenciálu jsme pak schopni pomocí zobrazovací techniky detekovat a snímat. K dispozici jsou i barviva určená k měření dalších parametrů, např. koncentrace volného intracelulárního vápníku, sodíku, draslíku, pH a dalších parametrů. Z nich asi nejvýznamnější skupinu představují barviva užívaná pro měření koncentraci

intracelulárního vápníku. Mezi základní požadavky na napětově citlivá barviva patří schopnost navázání barviva na buněčnou membránu. Přítomnost chromoforu ve skeletu molekuly. Snaha o vysokou intenzitu fluorescence a jejich stabilita při souvislém ozařování. Omezení jevu fotovybělování (photobleaching), kdy fluorofory jsou intenzivním světlem rozkládány a trvale ztrácejí schopnost fluorescence. Snaha o minimální vliv na biologické chování studované molekuly. [14] [15] [17] [19]

### 5.3 Napětově citlivá fluorescenční barviva

Obecně platí, že citlivost potenciometrických barviv na změny napětí jsou ovlivněny různými laboratorními podmínkami experimentu. L.B Cohen zabývající se experimenty na axonu chobotnice navrhl studoval vhodný poměr signálu k šumu pro různě citlivá fluorescenční barviva. Publikoval data o více než tisíci barvivech. U nově syntetizovaných barviv určil relativní změny absorpce a fluorescence na 100 mV. Nejrychlejší fluorescenční barviva vykazují relativní změny až 10% na 100 mV.

Napětově citlivá fluorescenční barviva můžeme rozdělit na základě jejich optické odpovědi, fototoxicity a interakcí s jinými molekulami na dvě skupiny:

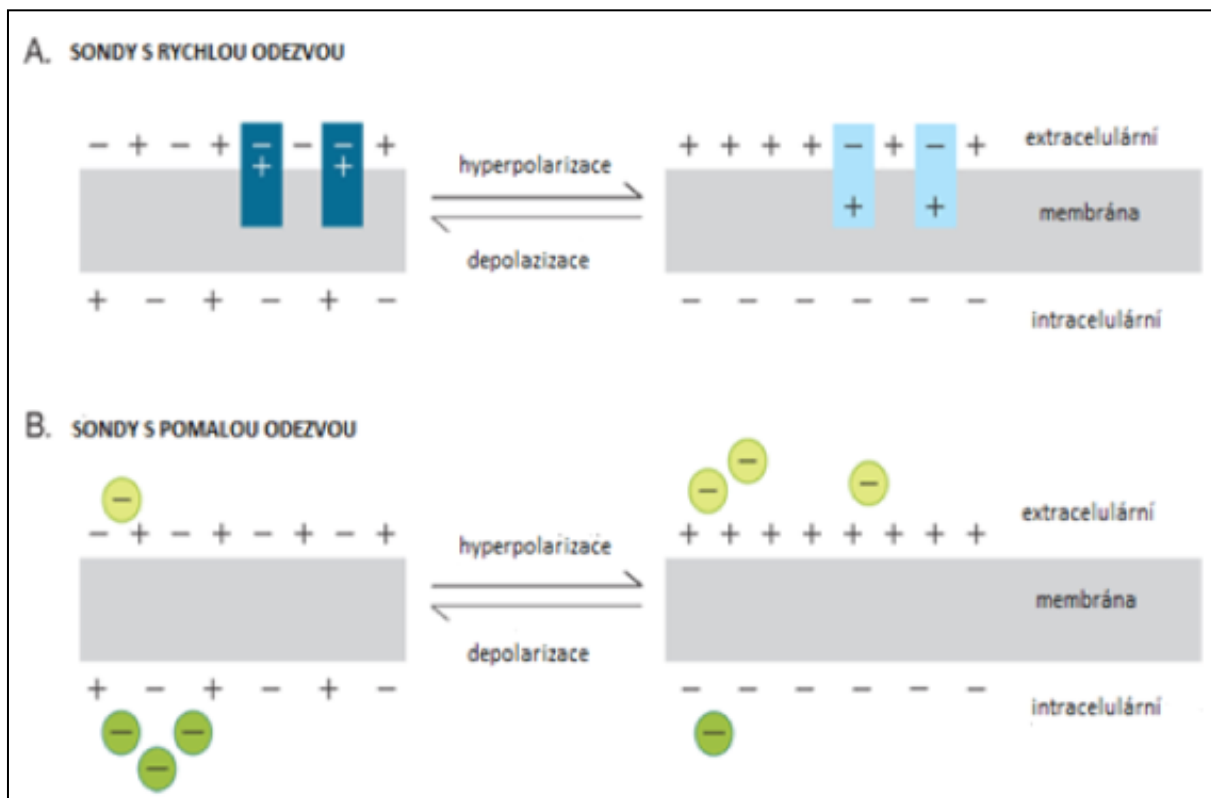
1. Fluorescenční barviva s rychlou odezvou:

vlivem změny okolního elektrického pole dochází ke změnám intramolekulární distribuce jejich náboje, což se projeví v rychlé změně jejich fluorescenčních parametrů (spektra nebo intenzity) - velikost této změny je často malá (2-10% na 100 mV). Jsou dostatečně rychlé pro měření potenciálových změn v excitabilních buňkách. [16]

2. Fluorescenční barviva s pomalou odezvou:

jsou to lipofilní aniony nebo kationy, které se přemísťují přes membránu elektroforetickým mechanismem a vykazují potenciálově závislé změny ve své transmembránové distribuci, která je provázena fluorescenčními změnami – velikost změny je typicky 1% na 1 mV. Patří sem kationtové karbocyaniny a rhodaminy a aniontové oxonoly. Jsou vhodné na měření změn průměrného membránového

potenciálu neexcitovatelných buněk, způsobených respirační aktivitou, propustností iontových kanálů, vazbou léčiv a jinými faktory. [15][17][18][19]



Obrázek 6: Princip fluorescenčních barviv s rychlou a pomalou odezvou na napěťový stimul.

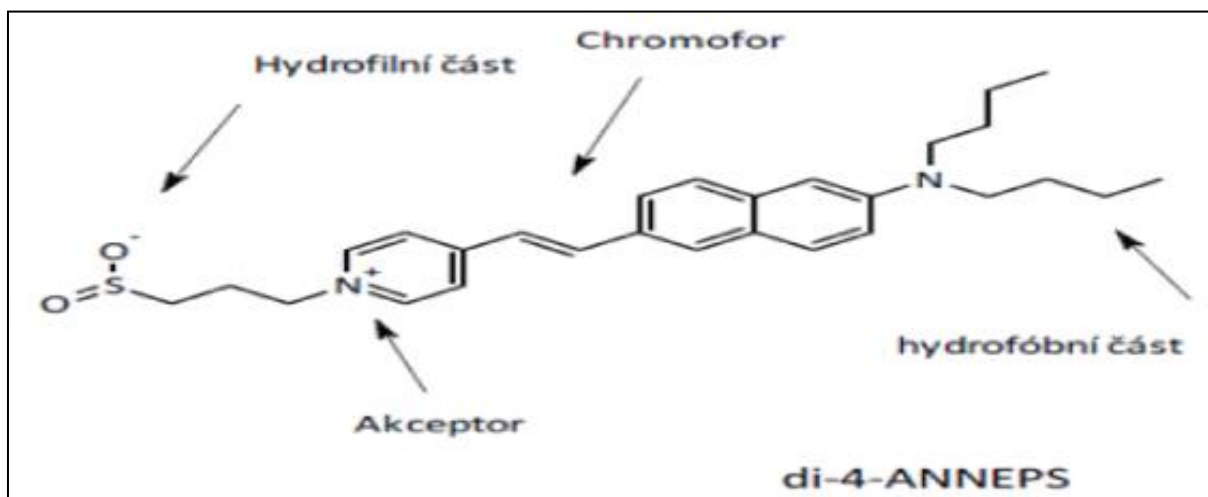
**Tabulka 1: Přehled napětově citlivých fluorescenčních barviv**

| fluorescenční barvivo   | struktura     | odezva   | použití  |
|---|---------------|--|--|
| Di-4-ANEPPS<br>Di-8-ANEPPS<br>Di-2-ANEPEQ<br>Di-8-ANEPPQ<br>Di-12-ANEPPQ  | styryl        | rychlá, fluorescence se snižuje při hyperpolarizaci membrány                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>mapování membránového potenciálu podél neuronů a svalových vláken</li> <li>kombinace potenciometrických a <math>\text{Ca}^{2+}</math> nebo elektrofyziologických měření</li> <li>detekce změn membránového potenciálu v odezvě na farmaceutický stimul</li> </ul> |
| RH 237<br>RH 414<br>RH 421<br>RH 795  | styryl        | rychlá, fluorescence se snižuje při hyperpolarizaci membrány                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>zobrazování membránových potenciálů</li> <li>funkční sledování neuronů</li> <li>detekce synaptické aktivity</li> </ul>  |
| RH 155  | hybrid oxonol | rychlá, mění se absorbance při cca 720 nm  | <ul style="list-style-type: none"> <li>neurony bezobratlých</li> <li>membránové potenciály ve svalové a nervové tkáni</li> <li>napětově řízené <math>\text{Ca}^{2+}</math> kanály</li> </ul>   |
| DiOC <sub>2</sub> (3)<br>DiOC <sub>5</sub> (3)<br>DiOC <sub>6</sub> (3)<br>DiSC <sub>3</sub> (5)<br>DiIC <sub>1</sub> (5) | karbocyanin   | pomalá, fluorescenční odezva na depolarizaci závisí na koncentraci a detekční metodě | <ul style="list-style-type: none"> <li>kalciové kanály</li> <li>aktivita mitochondrií</li> <li>neurony a mozková tkáň</li> <li>průtoková cytometrie</li> <li>membránový potenciál v kvasinkách</li> </ul>  |
| JC-1<br>JC-9  | karbocyanin   | pomalá, Em 585/520 se zvyšuje při hyperpolarizaci membrány                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>apoptická mitochondriální depolarizace</li> <li><math>\text{Ca}^{2+}</math> regulace mitochondriemi</li> <li>mitochondriální odezva na glutamátovou excitotoxicitu</li> </ul>   |
| Tetrametylrhodamin metyl Ester  | rhodamin      | pomalá   | <ul style="list-style-type: none"> <li>membránový potenciál v mitochondriích</li> <li><math>\text{Ca}^{2+}</math> regulace mitochondriemi</li> </ul>   |
| Oxonol V<br>Oxonol VI   | oxonol        | pomalá, fluorescence se snižuje při hyperpolarizaci membrány                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>rostlinná fyziologie</li> <li>iontové kanály a elektrogenní pumpy</li> <li>liposomy</li> </ul>  |
| DiBAC <sub>4</sub> (3)<br>B-24570<br>DiBAC <sub>2</sub> (5)<br>DiSBAC <sub>2</sub> (3)                                    | oxonol        | pomalá, fluorescence se snižuje při hyperpolarizaci membrány                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>kalcium a membránový potenciál</li> <li>životnost buněk průtokovou cytometrií</li> <li>konfokální mikroskopie</li> </ul>  |

### 5.3.1 Di-4-ANEPPS

Barviva skupiny ANEPP vyvinutá Leslie Loewem, patří mezi nejpoužívanější sondy pro měření elektrického potenciálu biomembrán. Primární účel tohoto barviva je fluorescenční mapování. Vykazuje poměrně vysoké změny fluorescence ku změně elektrického potenciálu (10%/100mV). Barviva typu ANEPP v podstatě nefluoreskují. Jejich fluorescenční vlastnosti se projeví až navázáním na příslušné prostředí. Tedy spektrální vlastnosti jsou závislé na molekule, na kterou jsou tato barviva navázána. Napětově citlivá barviva se využívají k záznamu přechodných změn potenciálů u různých srdečních preparátů a uplatňují se při mapování membránových potenciálů podél svalových vláken. [20][21]

Napěťová barviva nám umožňují snímat elektrickou aktivitu neuronů. Mohou poskytnout přesné informace o zahájení akčního potenciálu a jeho šíření. Používají se v případech, kdy není možné použít mikroelektrodotový systém. Můžeme tedy měřit prostorové a časové změny potenciálu na povrchu buňky. Tato metoda je zvláště vhodná pro studium činnosti mnohobuněčných preparátů. Jako negativní aspekt tohoto barviva se může jevit jeho fytotoxicita. Kdy při zvýšené intenzitě světla nebo vysoké koncentraci může působit toxicky. Může docházet ke zvýšení membránové permeability a snížení membránové depolarizace buňky. A také může dojít k omezení transportu sodíkových iontů do buňky. [22][23][24]

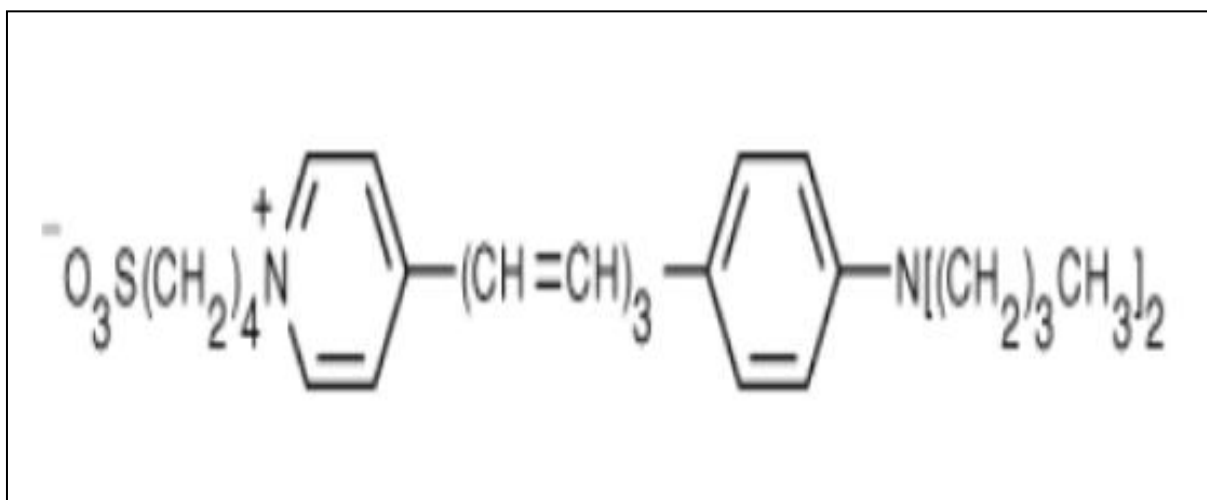


**Obrázek 7: Chemická struktura fluorescenčního barviva Di-4-ANNEPS.**

### 5.3.2 RH 237

Stejně jako ANEPP barviva i RH barviva patří do chemické skupiny styryl. Vykazují různé stupně fluorescenční excitace a přesuny emisních spekter v závislosti na potenciálních změnách na membráně. Jejich excitační a emisní spektra jsou také závislá na prostředí, ve kterém jsou navázány. Excitační a emisní spektrum bylo měřeno např. na plasmatické membráně neuronů, kdy bylo naměřeno maximum excitačního spektra na 528 nm a maximum emisního spektra na 782 nm, kdy jako medium byl použit methanol. Fyziologické účinky s různými analogy barviv si nejsou rovnocenné. Rh barviva jsou využívána pro optické záznamy poskytují přesné morfologické změny membránového potenciálu během a bezprostředně po stimulaci a defibrilaci srdce, zatímco konvenční elektrodové techniky trpí artefakty vyvolaných během a po podnětech polarizací elektrod. [25][26]

Dále se používají k detekci synaptické aktivity a k funkčnímu zobrazování neuronů. Snímání elektrofyziologie napěťově řízených vápníkových kanálů. Nebo optického mapování srdce, izolovaného podle Lagendorfa. V publikacích se také setkáváme s články, které se věnují přilnavosti fluorescenčního barviva na lipidovou membránu buňky. [23][27]



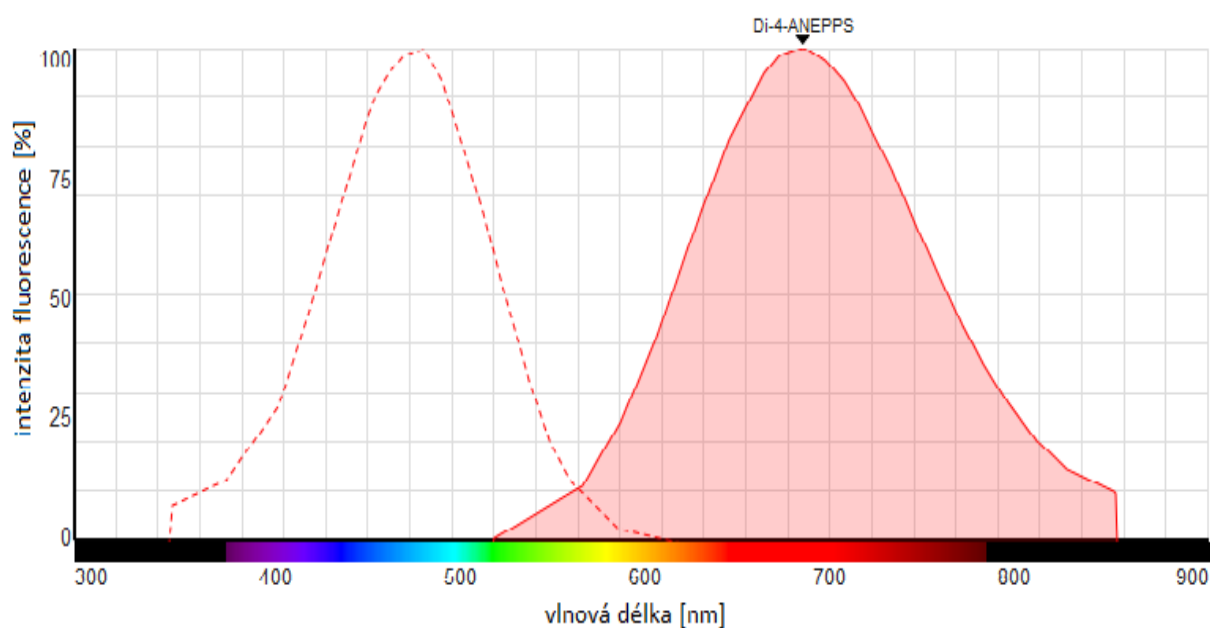
Obrázek 8: Chemická struktura fluorescenčního barviva RH237.



### 5.3.3 Absorpční a emisní spektrum fluorescenčního barviva

Membránová barviva s rychlou odezvou patřící do skupiny styryl (Di-4-ANNEPS, Rh237), jsou amfifilního charakteru. Jsou tvořena uhlíkovými řetězci, které působí jako membránové kotvy a hydrofilní skupinou, která nese chromofor. Chromofor je připojen na vnější stranu membrány a druhým koncem se váže na vnitřní stranu membrány buňky. Toto navázání zaručuje kolmé postavení chromoforu vzhledem k membráně a vnějšího prostředí buňky. Z chemické struktury barviva vychází, že kladný náboj je lokalizován poblíž molekuly dusíku v základním stavu a kyslíku ve stavu vybuzeném. Tedy podrážděním dojde k redistribuci tohoto kladného náboje. Kolmá orientace chromoforu způsobuje, že redistribuce náboje je paralelní s vnitřním napětím membrány buňky. Změna napětí na membráně způsobí posun spektra, který je dán přímou interakcí mezi změnou napětí základních a excitovaných stavů dipólových momentů. Rozdíl je tedy vidět v posunu absorpčního a fluorescenčního spektra. Tedy pokud bude membrána buňky v depolarizovaném stavu, dojde k posunu spektra k nižším vlnovým délkám. Ideálně by obě spektra měla být symetrická, pouze posunutá v závislosti na elektrické aktivitě membrány. Intenzita fluorescence se snímá z nejstrmější části spektra, kde dochází k nejvýznamnějším změnám intenzity.

[20][21][29][30]



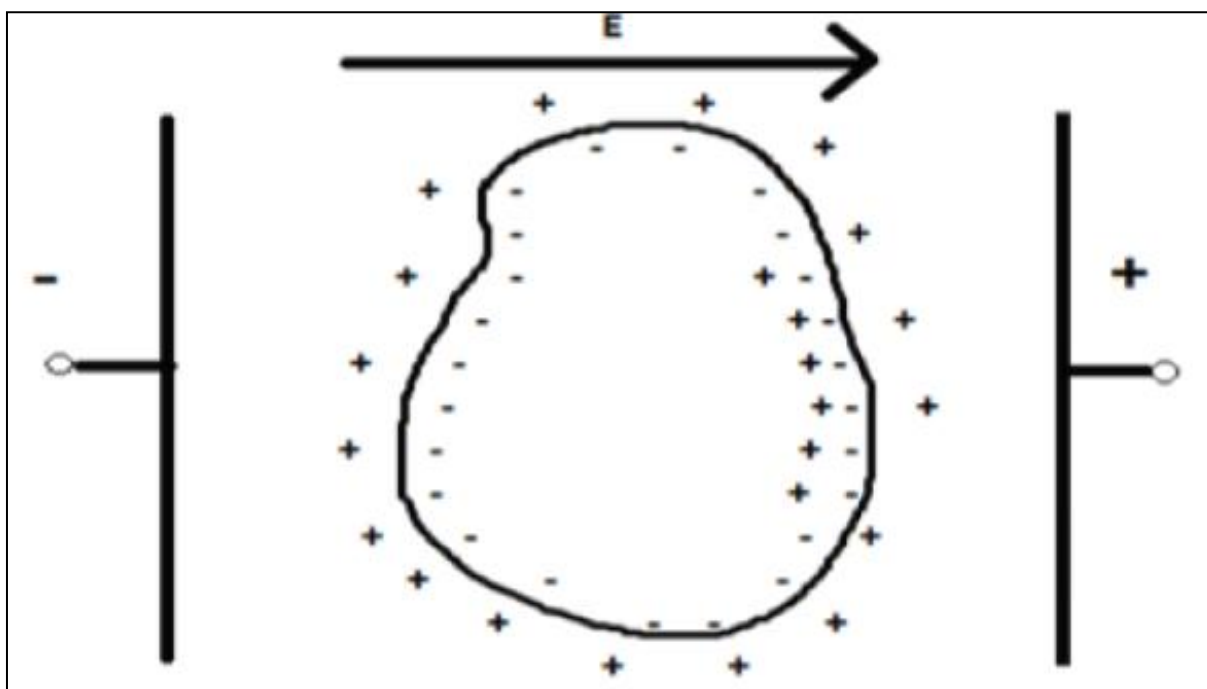
Obrázek 9: Modelový příklad fluorescence excitačního a emisního spektra Di-4-ANNEPS. Fluorescence měřena na roztoku plazmatických bílkovin s použitým fosfátovým pufrům.

## 6. Experimentální část

Experimentální část mé práce zahrnovala přípravu vzorků pro mikroskopování a snímání intenzity fluorescence pomocí konfokálního mikroskopu. Náplní práce bylo otestovat vhodnost měření membránového napětí na dostupných buňkách s využitím napěťově citlivých sond Di-4-ANEPPS a RH237. K měření mi byly dostupné prostory biofyzikální laboratoře Vysokého učení technického. Volné buňky byly poskytnuty biologickým ústavem Masarykovy univerzity.

### 6.1 Popis experimentu

Pro lepší pochopení experimentu uvažujeme buňku, která má definované rozmístění iontů uvnitř a vně membrány. Tato distribuce iontů způsobuje klidové membránové napětí. Vložíme-li buňku do elektrického pole mezi dvě elektrody, dojde k redistribuci těchto iontů na obou stranách membrány. Výsledkem je indukce napětí na membráně, které se sčítá s klidovým napětím a vymizí s odstraněním elektrického pole (Obr.10). K největší změně napětí dochází na membráně nejbližší k elektrodám.

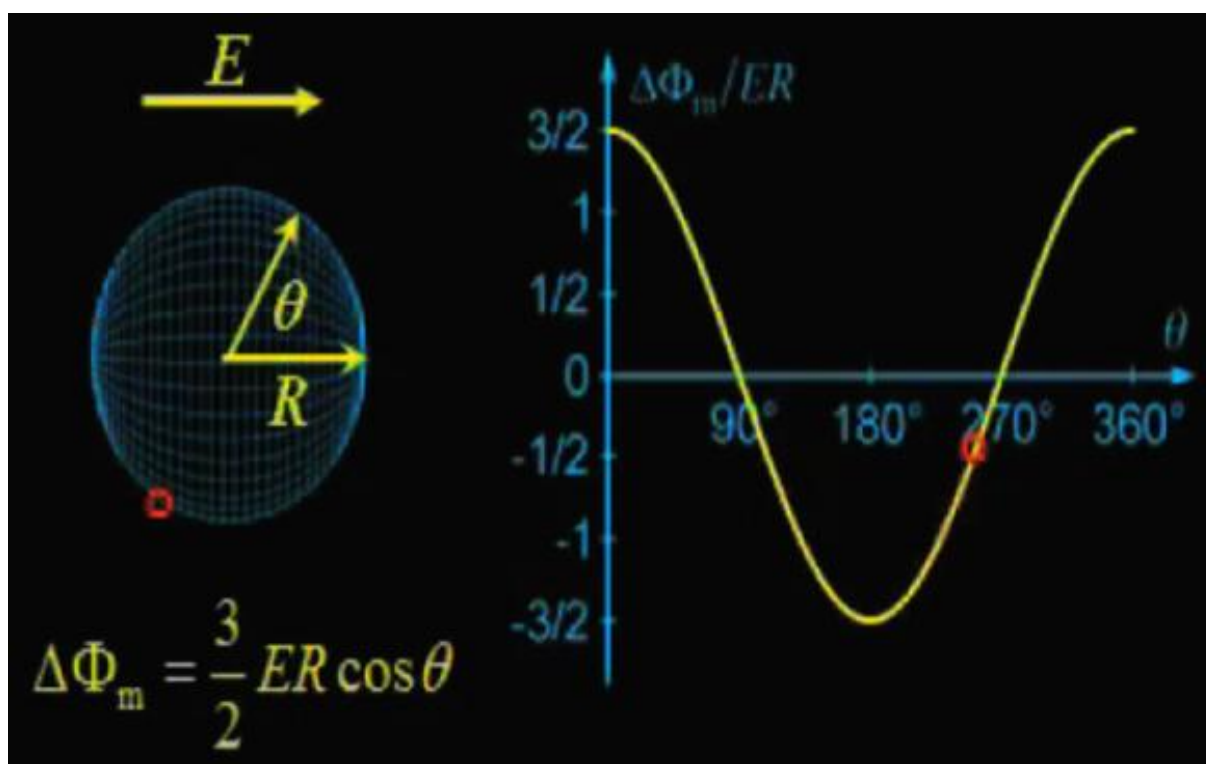


Obrázek 10: Buňka po vložení do elektrického pole.

Pro buňky s jednoduchým tvarem, lze membránový potenciál vypočítat analyticky s využitím Schwanovy rovnice.

$$\Delta\Phi_m = \frac{3}{2}ER\cos\theta \quad (2)$$

Tato rovnice udává indukované membránové napětí  $\Delta\Phi_m$  úměrné intenzitě elektrického pole  $E$  a velikosti buňky a funkci kosinus podél její membrány. U složitějších tvarů buněk se kosinová funkce může lišit od indukovaného membránového napětí a je potřeba, aby bylo vypočteno numericky na počítači nebo experimentálně pomocí napětově citlivých barviv. Jako testovací fluorescenční barviva byla použita di-4-ANEPPS a RH237, sondy s rychlou odezvou na změnu napětí a proměnou spektrální závislostí na bezprostředním okolí. [15][31]



Obrázek 11: Schwanova rovnice.[31]

## 6.2 Příprava buněčného vzorku

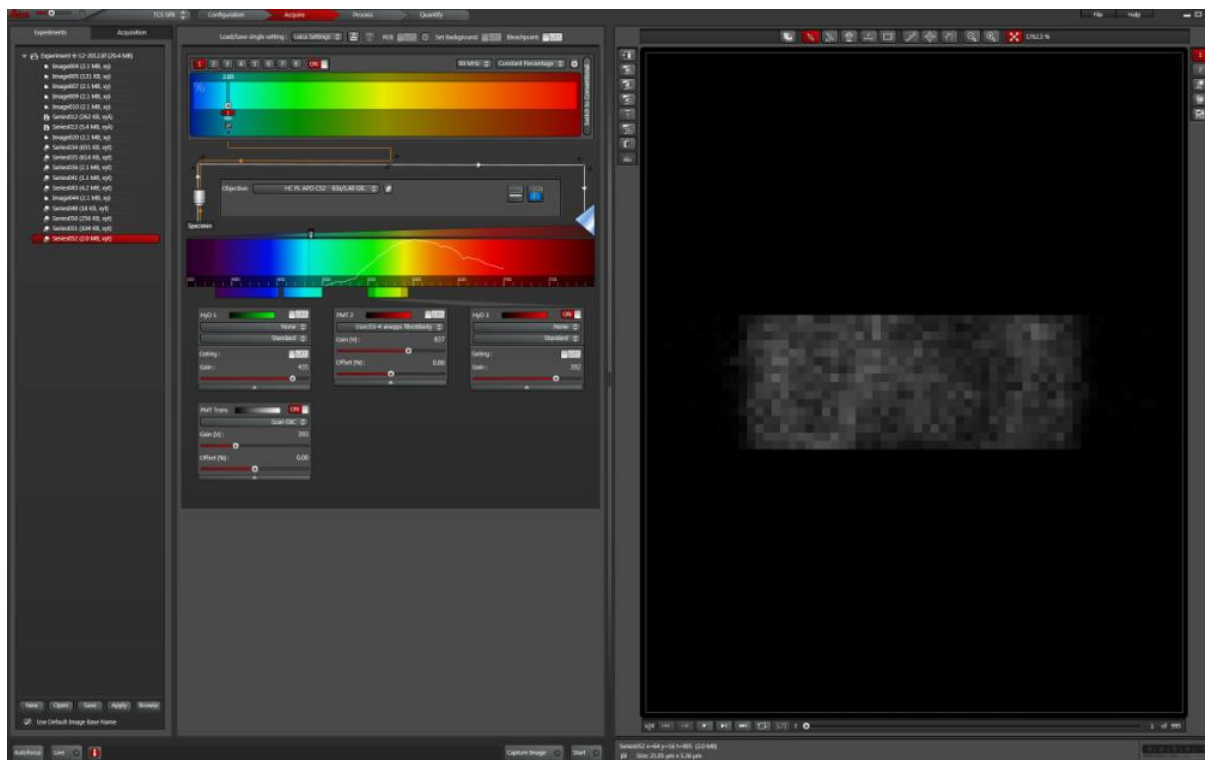
Pro samotné experimentální měření bylo využíváno kultivovaných buněk. Pro testování byly vybrány konkrétní typy buněk myší fibroblasty. Tyto buňky měly dostatečný tvar a velikost a jeví se tedy vhodné pro další měření. Do zkumavky, kde bylo předem nepipetováno 100  $\mu$ l kultivovaných buněk se přidá 1ml roztoku média. Tento roztok obsahující anorganické soli a glukózu, se používá jako náhrada biologického prostředí. Dále je využito napětově závislé barvivo Di-4-ANEPPS a RH237 v různých koncentracích 2,5  $\mu$ l , 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l. Pro lepší navázání barviva na buněčnou membránu se přidává 10  $\mu$ l roztoku pluronicu. Takto připravený buněčný roztok necháme inkubovat po dobu 30 minut. Inkubovaný roztok dále centrifugujeme, abychom docílili správného oddělení buněk od roztoku. Centrifugaci je vhodné po výměně média opět opakovat. Barvivo, které se nezachytí na membráně je tak lépe odstraněno.

Tabulka 2: Přehled použitého materiálu

| Přehled použitého materiálu |                                     |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| látka                       | Množství                            |
| roztok s buňkami            | 100 $\mu$ l                         |
| médium                      | 1ml                                 |
| Di-4-ANEPPS/ RH237          | 2,5 $\mu$ l , 5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l |
| pluronic                    | 10 $\mu$ l                          |

## 6.3 Měření na konfokálním mikroskopu

Po důkladné přípravě a obarvení buněčného roztoku je potřeba pod mikroskopem najít a zaostřit buňku, která bude vhodná pro snímání intenzity fluorescence. Tato buňka by měla mít ideálně kulatý tvar a fluorescenční barvivo by mělo být navázáno na membráně. Pro lepší zobrazení nám slouží softwarové vybavení konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 (Obr.10). Toto prostředí slouží k navolení potřebných parametrů snímání a detekování obrazů buňky. Pro zobrazení se využívá imerzní objektiv se zvětšením 64x. Jako excitační zdroj energie je použit laser. Pro fluorescenční barvivo Di-4-ANNEPS byla zvolena maximální excitační vlnová délka 480 nm, pro barvivo RH237 530 nm. [28]



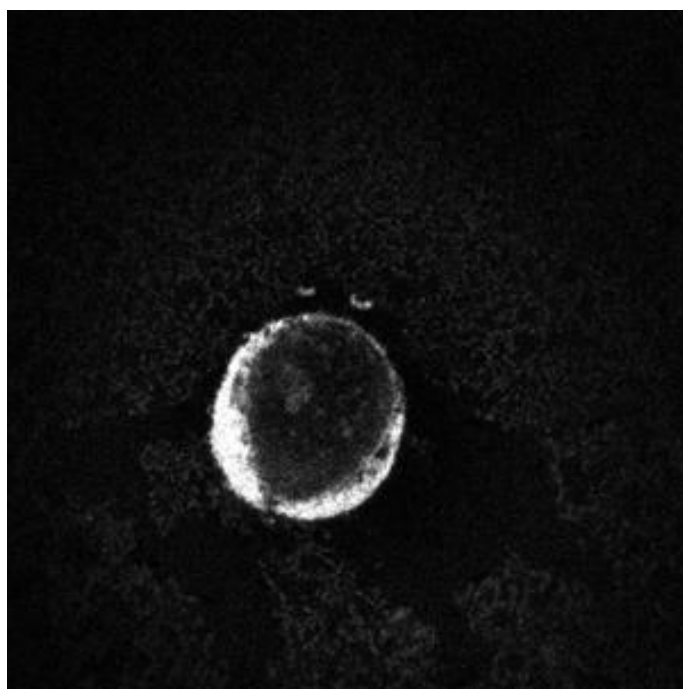
Obrázek 12: Softwarové prostředí konfokálního mikroskopu.

Pro detekci signálu můžeme využít funkce tří detektorů, kdy máme na výběr mezi fotonásobiči a hybridním detektorem. Pro naše měření byly použity vždy fotonásobiče. Nastavením a posunem vlnových délek můžeme měnit excitační vlnovou délku a snímat intenzitu emisního záření. Tedy můžeme získat emisní spektra vzorků. Mezi další parametry, které můžeme nastavit, je rychlost skenování snímků. S větší rychlostí snímání získáme větší počet obrázků za sekundu, ale sníží se nám doba akvizice snímání. To přispívá ke zhoršení kvality obrázků. Tuto rychlost můžeme zvýšit zapnutím obousměrného skenování a volit tak kompromis mezi rychlostí a kvalitou snímaného obrázku. Obousměrným skenováním nám zvýší skener získaný počet snímků za sekundu, protože nám skener snímá řádky obrazů postupně zleva doprava a naopak. Získaný počet snímků můžeme taky ovlivnit nastavením hodnoty průměrování řádků. S vyššími hodnotami průměrování řádků nám klesá počet naskenovaných snímků za sekundu. Dalšími parametry, které ovlivňují rychlost skenování jsou formát obrázku a frekvence skenování. S velikostí formátu obrázku klesá rychlost jejich snímání, tedy získáme menší množství snímků za sekundu. S rostoucí frekvencí skenování se opět zhoršuje kvalita snímků (Tab.3).

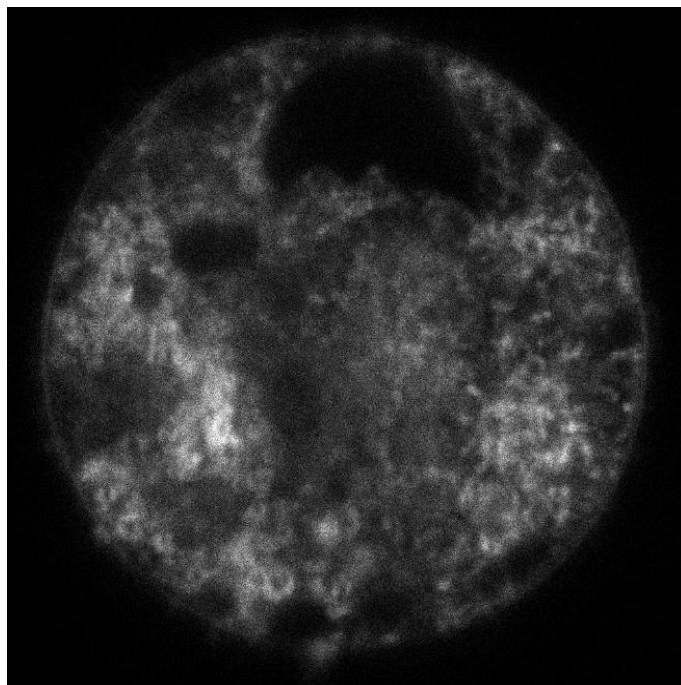
Pro každý puls je potřeba udělat sérii snímků buněčné membrány tak, aby byl zachycen průběh intenzity fluorescence v průběhu pulzu a po skončení pulzu. Tedy generování

impulsů by mělo být synchronizováno spolu se snímáním obrazů, což bohužel náš systém neumožňoval a stimulace byla spouštěna manuálně. Byly voleny 2 s a 5 s stimulační impulzy.

Získané snímky jsou pro ilustraci zobrazeny na obrázku (11) a (12). Na obrázku 11 je zobrazena buňka fibroblastu, která je barvena napětově citlivým barvivem Di-4-ANNEPS. Bylo použito 2,5  $\mu$ l tohoto barviva. Můžeme vidět, že barvivo je dobře navázáno na membránu, a tedy je toto použité množství vhodné pro měření. Intenzita jasu je na pohled dobře detekovatelná. Pro barvivo RH237 s použitým množstvím 2,5  $\mu$ l, buňka fibroblastu nebyla na snímku vůbec viditelná, tedy je zde pro ilustraci uveden obrázek s 10  $\mu$ l RH237.



Obrázek 13: Buňka fibroblastu barvená Di-4-ANNEPS snímána konfokálním mikroskopem. Zvětšení mikroskopu 64x.

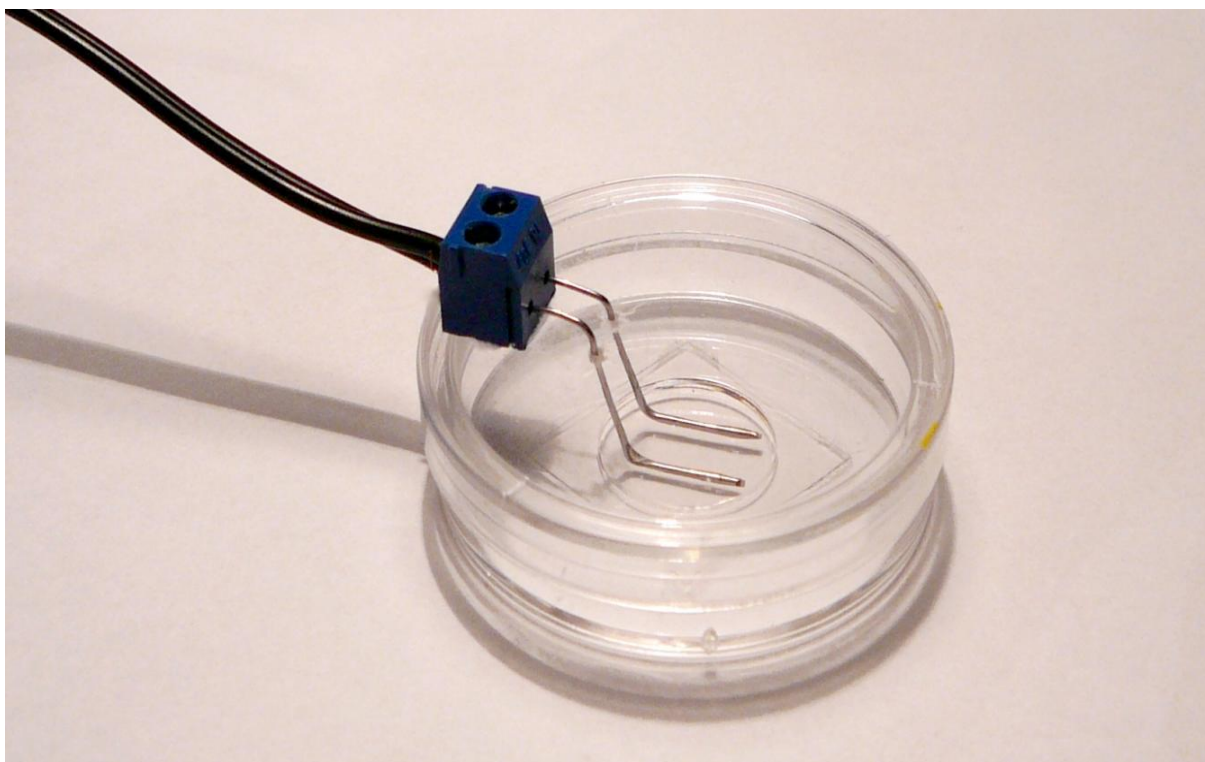


Obrázek 14: Buňka fibroblastu barvená RH237 snímána konfokálním mikroskopem. Zvětšení mikroskopu 64x.

## 6.4 Elektrodotový systém

Buňky jsou pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8. Buňky jsou napipetovány v misce se středovou jamkou a umístěny pod mikroskop. Aby bylo možno buňky stimulovat a měnit membránové napětí na buňce, bylo potřeba vytvořit elektrodotový systém, který by vhodně stimuloval buňky. Tento systém tvoří paralelně spojené izolované elektrody. Jejich průměr činí 0,5mm a vzdálenost mezi nimi je 4mm. Jsou uloženy na dno misky do středové jamky tak, aby byly zcela pokryty médiem se vzorkem a mohly tak buňku stimulovat. Elektrody jsou dále spojeny s počítačem a elektrickým zdrojem. Abychom zachovali životaschopnost buněk, elektrické impulzy musí mít relativně malé amplitudy o dostatečně krátkém trvání. V tomto experimentu se využívají čtvercové impulzy o 30 V, vytvořené pomocí stejnosměrného napětí. Mezi izolovanými elektrodami se tedy indukuje elektrické pole, které vytváří napětí na membráně buňky. Toto elektrické pole tedy mění rozložení iontů na povrchu membrány.





Obrázek 15: Navržený elektrodový systém.



### 6.4.1 Měření s použitým elektrodovým systémem

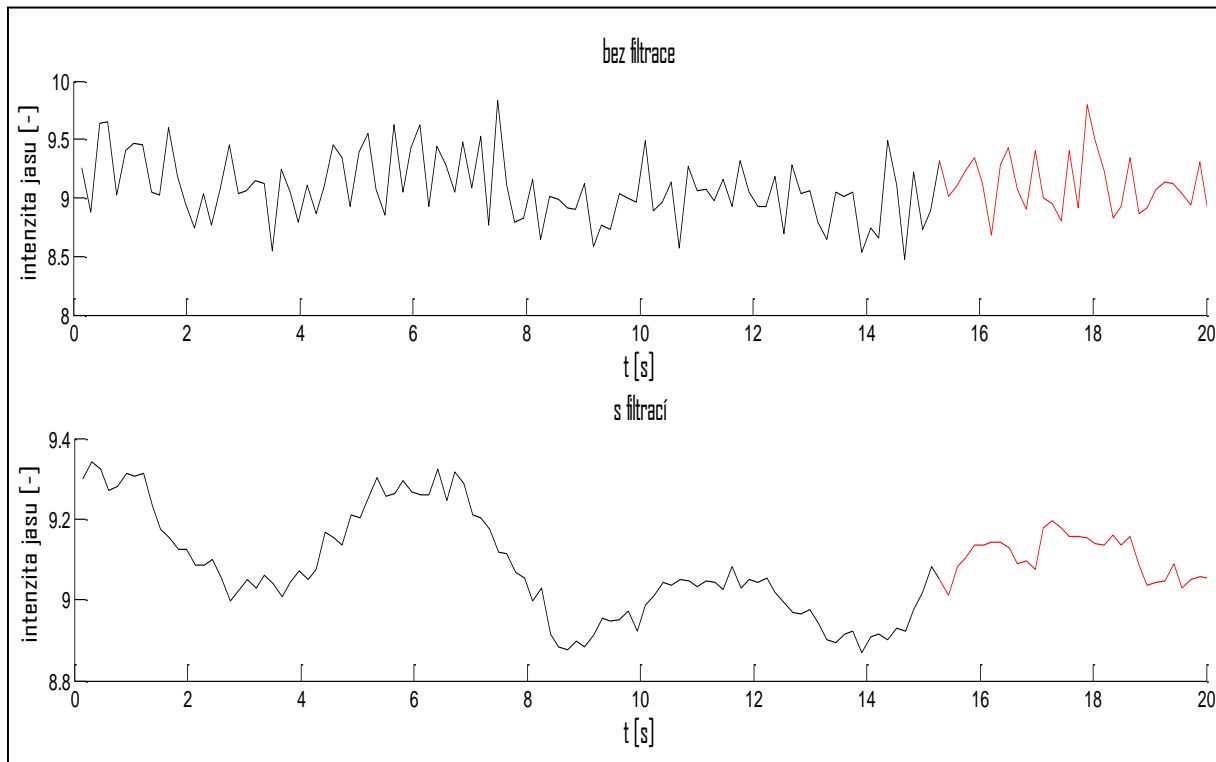
Po zapojení elektrodového systému k počítači, manuálně nastavíme stimulační pulzy, které indukují elektrické pole v okolí snímané buňky. K nastavení impulzů nám sloužil program vytvořený v prostředí Labview, který nám poskytl pan Ing. Vratislav Čmiel. Můžeme tak měřit odpověď napětově citlivých barviv na změnu napětí na membráně buňky. V programovém prostředí konfokálního mikroskopu jsme měli možnost postupně volit různé kombinace formátu a frekvence skenování obrázků. Nastavení těchto parametrů mělo vliv na množství snímaných obrázků za sekundu.

Pro vyhodnocení všech naměřených sekvencí obrazů je potřeba vytvořit program, který by množství snímků získaných konfokálním mikroskopem zpracoval. Pro posouzení sekvencí snímků, které byly uloženy ve formátu TIF byl vytvořen v prostředí MATLAB program s názvem `fluorescenci_barviva.m`. Po spuštění programu si můžeme načíst zvolená data, tedy naše získané snímky z jednotlivých měření pomocí funkce `imread`. Z důvodu rychlejšího výpočtu v MATLABU jsou data převedena pomocí funkce `im2double`. Výstupem programu je barevně rozlišený graf, který zpracovává celé sekvence obrazů a zobrazuje intenzitu fluorescence před a po sepnutí pulzů. Protože výsledné grafy jsou zatíženy velkým šumem, pro lepší hodnocení jsou zde uvedeny také grafy po filtraci průměrováním s nastavitelnou délkou okna realizovanou funkcí `mean`. Pro lepší přehlednost jsou grafy barevně odlišeny. Černá barva zvýrazňuje dobu, kdy byly spouštěny elektrické impulzy, červená barva nám znázorňuje signál bez těchto impulzů.

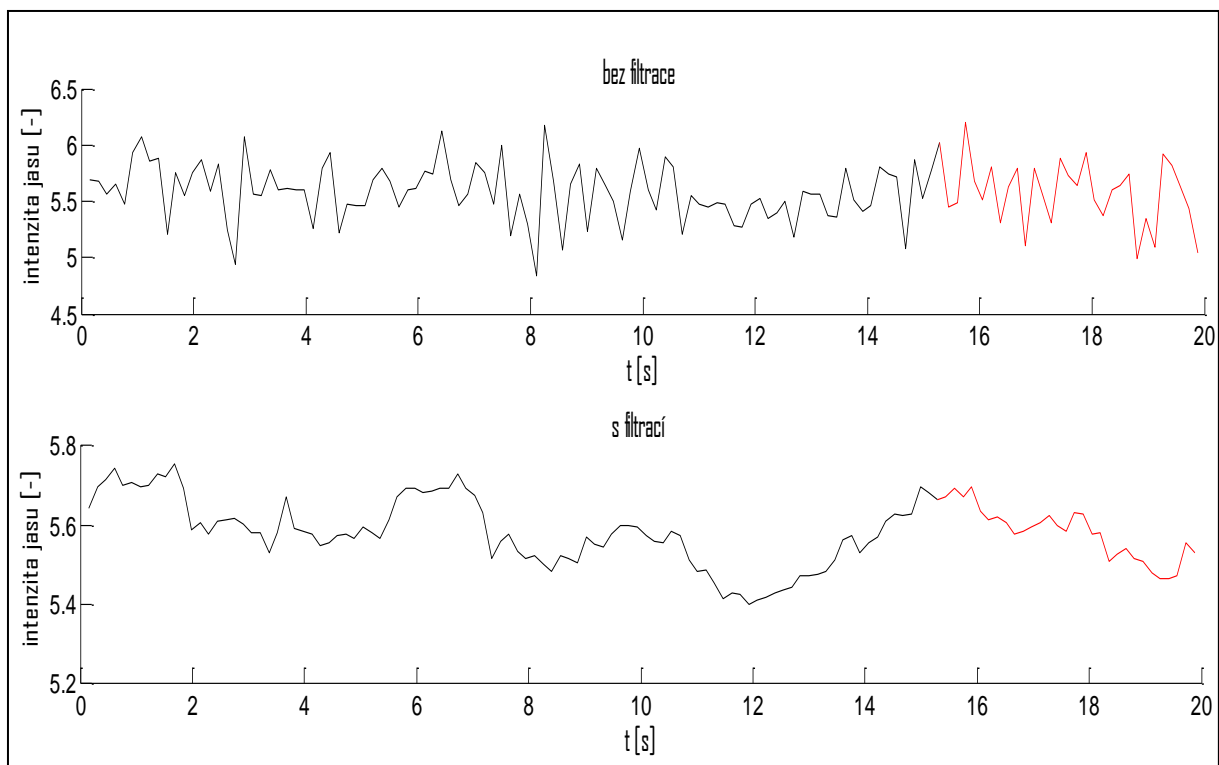
Tabulka 3: Přehled daných měření

| rozlišení v pixelech | rychlost snímání skeneru[Hz] | počet snímků za sekundu | obousměrné skenování | počet průměrování řádku | délka stimulačních impulzů[s] |
|----------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 64 x 16              | 400                          | 6,54                    | ne                   | 3                       | 2                             |
| 64 x 16              | 1800                         | 25,21                   | ne                   | 3                       | 2                             |
| 64 x 64              | 1800                         | 8,36                    | ne                   | 3                       | 2                             |
| 64 x 16              | 400                          | 5,78                    | ne                   | 1                       | 5                             |
| 128 x 128            | 700                          | 9,99                    | ano                  | 1                       | 5                             |
| 128 x 128            | 700                          | 5,14                    | ne                   | 1                       | 5                             |

Nastavením velmi malého formátu 64x16 a frekvence snímání  $f_s = 400$  Hz jsme získali rychlost skenování 6,54 snímků za sekundu. V programovém prostředí konfokálního mikroskopu bylo nastaveno průměrování řádků na hodnotu 3. Před spuštěním snímání obrázků byly sepnuty elektrické impulzy o délce 2 s. Po nasnímání dostatečného množství obrazů byly stimulační impulzy vypnuty a snímání pokračovalo do konce bez stimulace. Pro barvení buněčného roztoku bylo použito 5  $\mu$ l napětově citlivého barviva Di-4-ANNEPS (Obr.16). Měření bylo provedeno, také s použitým napětovým barvivem RH237 (Obr.17). Ale na rozdíl od Di-4-ANNEPS, kdy bylo použito 5  $\mu$ l tohoto barviva, jsme použili 10  $\mu$ l tohoto barviva. Nastavením vyšší hodnoty průměrování jednotlivých řádků, můžeme eliminovat chyby vzniklé při měření. Získaný signál, který slouží k zaznamenání změn fluorescence je pro obě barviva příliš zašuměný. Po vyfiltrování signálů, si můžeme všimnout skokových změn intenzit. Tyto změny intenzity by měly být odezvy na elektrický impuls, který mění napětí na membráně buňky. Změny v intenzitě signálu jsou zachyceny také v části bez elektrických impulsů. Tedy nemůžeme s přesností říci, zda jsou změny intenzity vyvolány změnou elektrického pole nebo jsou zatíženy šumem.

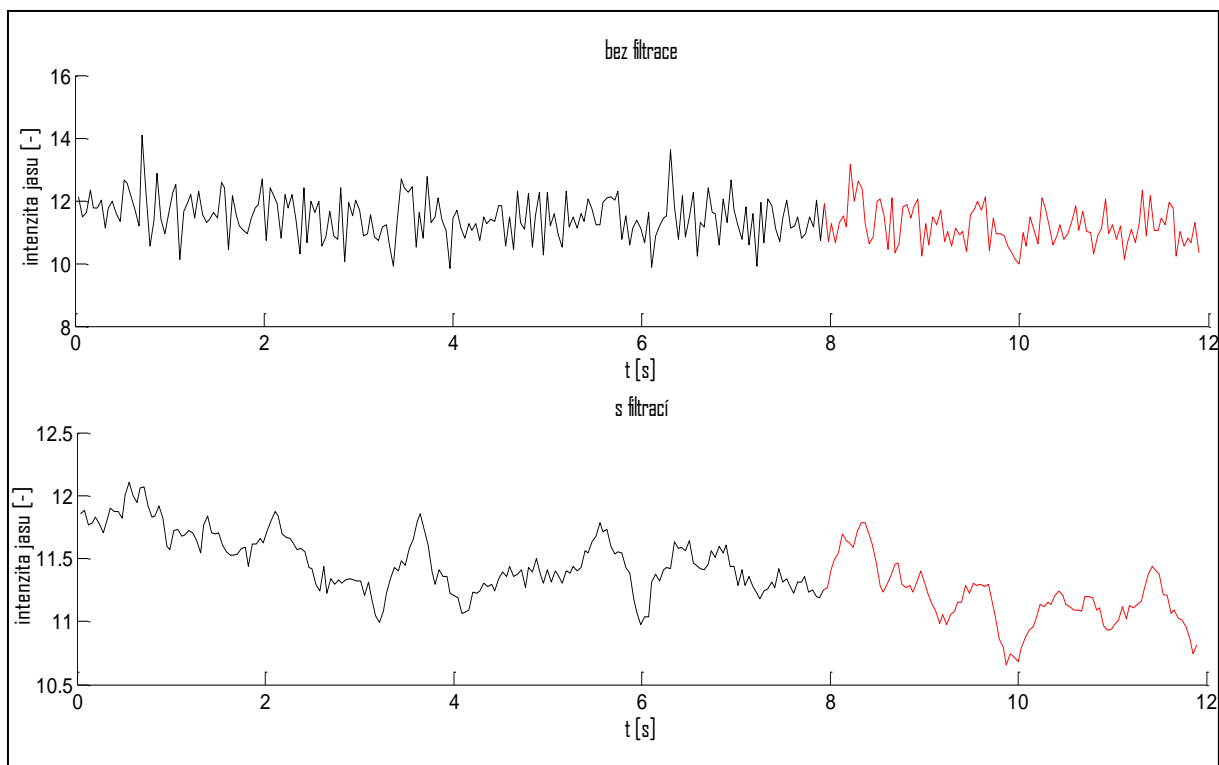


**Obrázek 16:** Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS . Formát 64x16,  $f_s = 400$  Hz, rychlost skenování 6.54 snímků za sekundu, délka impulsu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 3. (černá – doba trvání elektrického impulsu, červená – bez impulsu)

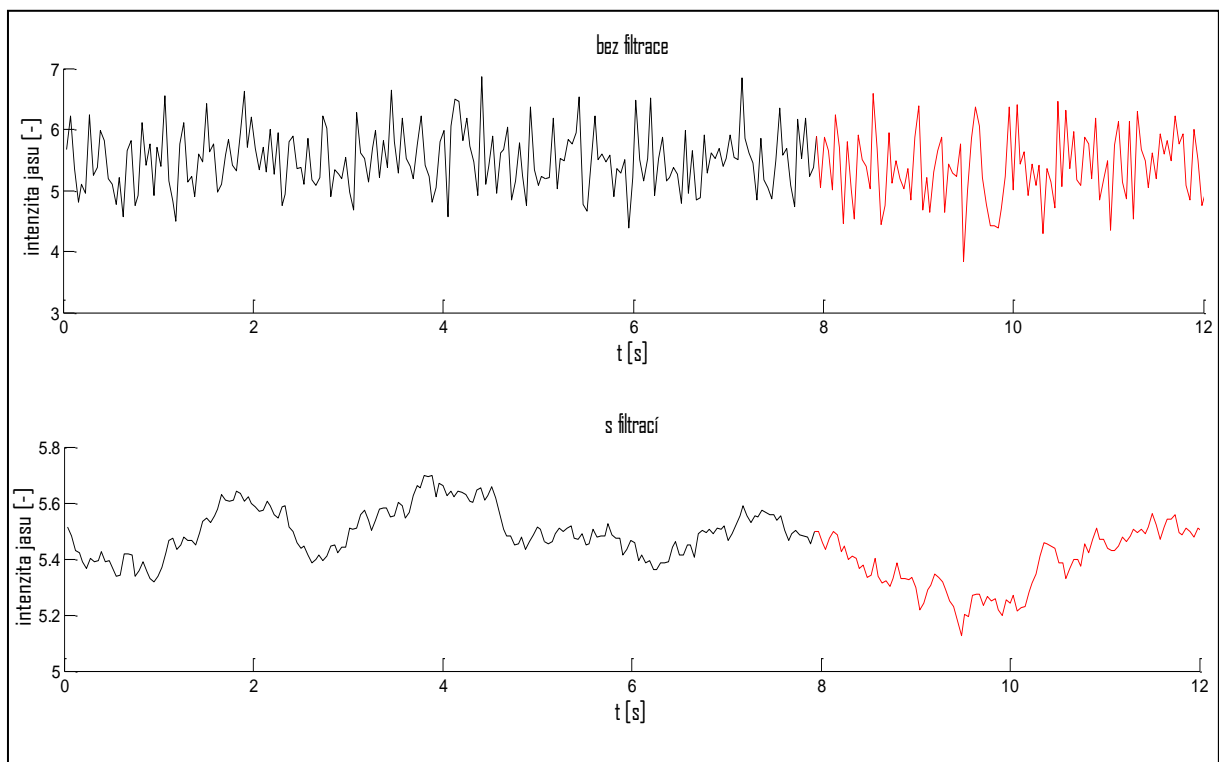


Obrázek 17: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 64x16,  $f_s = 400$  Hz, rychlost skenování 6.54 snímků za sekundu, délka impulsu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulsu, červená – bez impulsu)

V dalším měření jsme opět použili stejný formát 64x16, ale zvýšili jsme frekvence snímání na  $f_s = 1800$  Hz. Vysokou hodnotou frekvence skenování jsme dosáhli vyššího počtu snímaných obrázků za sekundu 21,81. Před skenováním obrázků byly spuštěny elektrické impulzy o délce 2 s. Po nasnímání dostatečného množství obrázků byly stimulační impulzy vypnuty a snímání pokračovalo do konce bez stimulace. Pro fluorescenční barvivo Di-4-ANNEPS bylo použito 5  $\mu$ l tohoto barviva (Obr.18). U barviva RH237 bylo použito dvojnásobné množství (Obr.19). Jelikož jsme použili vysoké skenovací frekvence a snížili jsme tak akviziční dobu snímání, dochází ke zhoršení kvality snímků. Signály obou obrázků jsou hodně zatíženy šumem. Tento šum by mohl být částečně eliminován použitým vyšším průměrováním jednotlivých řádků.

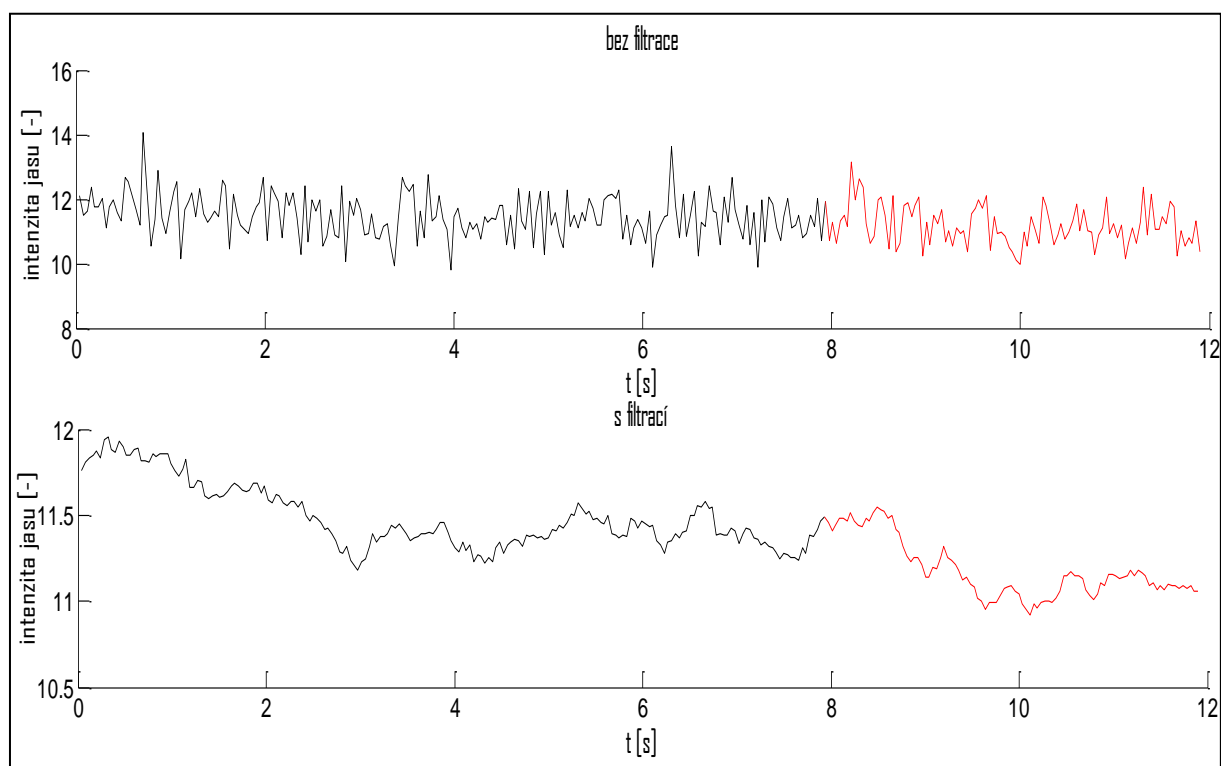


Obrázek 18: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS. Formát 64x16,  $f_s = 1800$  Hz, rychlost skenování 21.81 snímků za sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu)

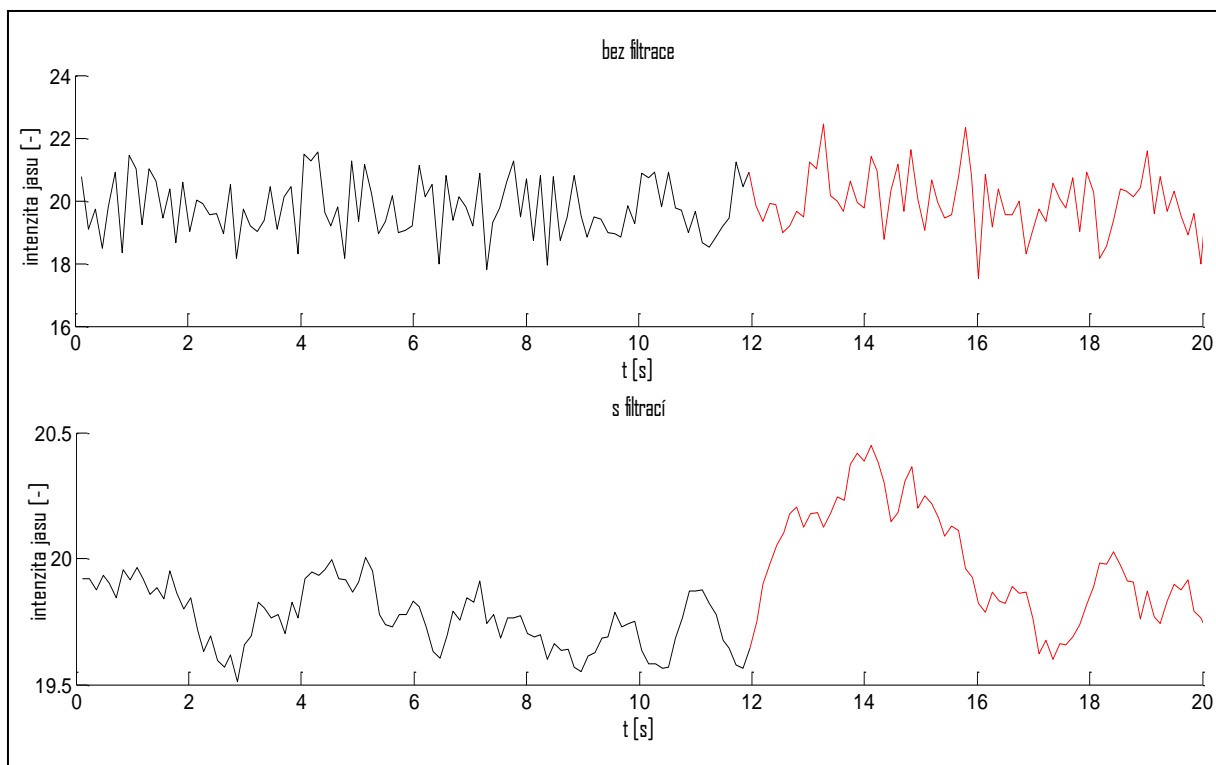


Obrázek 19: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 64x16,  $f_s = 1800$  Hz, rychlost skenování 21.81 snímků za sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 11. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu)

Nastavením formátu 64x64, frekvence na  $f_s = 1800$  Hz a nastavením hodnoty průměrování řádků na 3, jsme získali rychlost skenování 8,36 snímků za sekundu. Před spuštěním snímání obrázků byly sepnuty elektrické impulzy a délce 2 s. Po nasnímání dostatečného množství obrazů byly stimulační impulzy vypnuty a snímání pokračovalo do konce bez stimulace. Pro barvení buněčného roztoku bylo použito 5  $\mu$ l napětově citlivého barviva Di-4-ANNEPS (Obr.20) a 10  $\mu$ l fluorescenčního barviva RH237 (Obr.21). Přestože jsme použili vysoké frekvence skenování, množství získaných snímků je nižší vzhledem k vyššímu použitému formátu. Na prvním obrázku po filtraci si můžeme povšimnout klesající intenzity signálu. Na druhém obrázku můžeme vidět změnu v intenzitě signálu směrem k vyšším hodnotám, také po vypnutí stimulačních impulzů. V této části signálu, už by nemělo docházet ke změnám elektrického pole v okolí buňky, a tedy ani ke změnám iontového složení na membráně buňky.

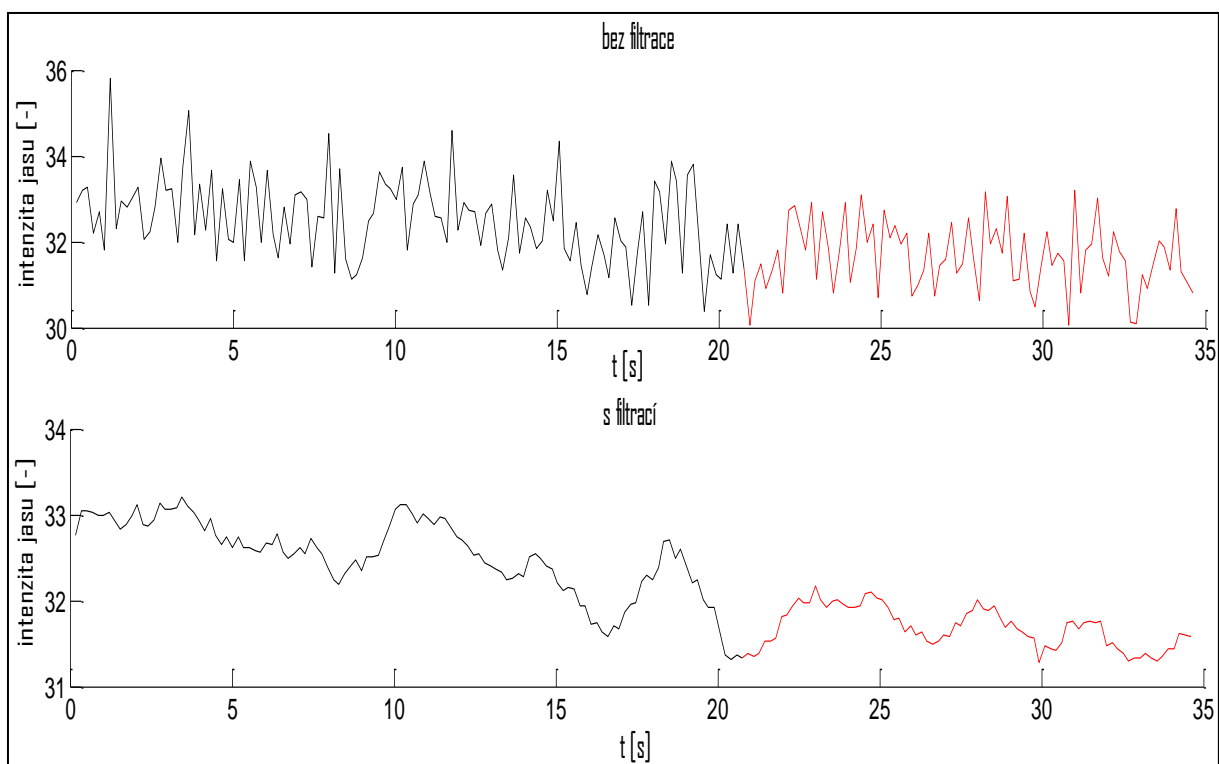


**Obrázek 20:** Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS. Formát 64x16,  $f_s = 1800$  Hz, rychlost skenování 8.36 snímků za sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 9. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu)

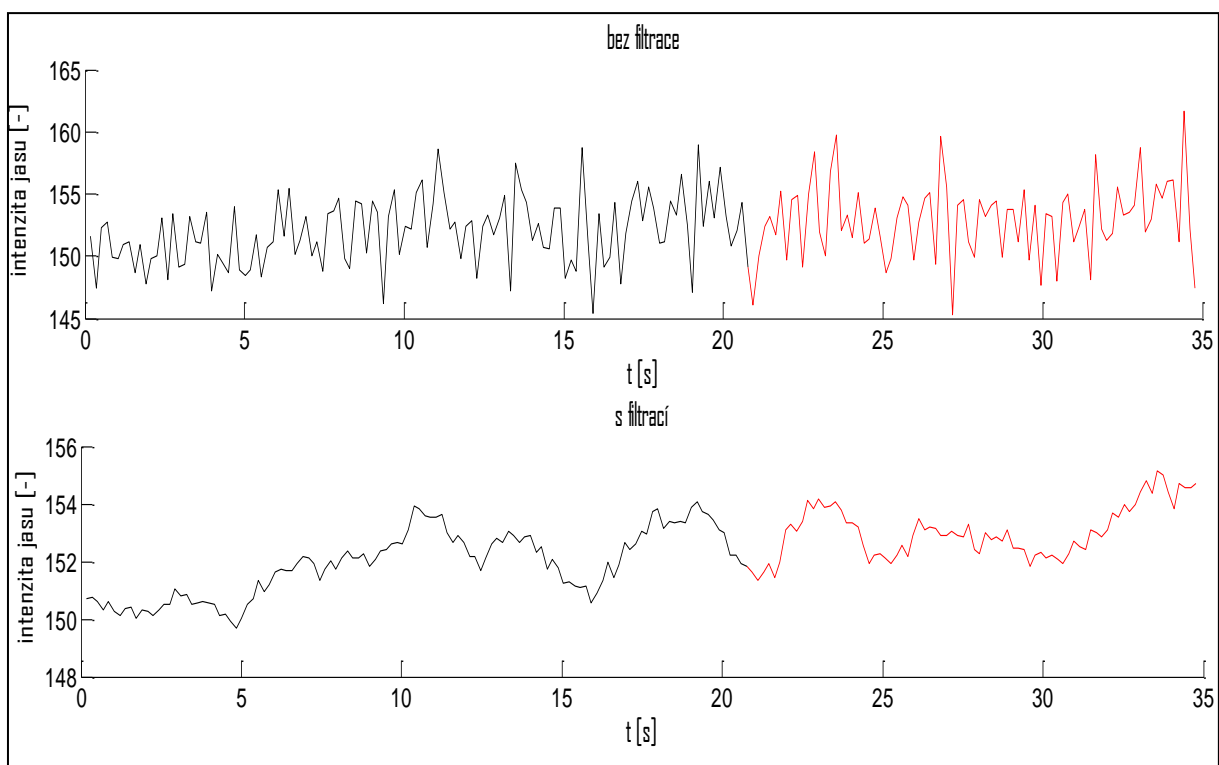


**Obrázek 21:** Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 64x64,  $f_s = 1800$  Hz, rychlost skenování 8.36 snímků za sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 9. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu)

Nastavením formátu 64x64,  $f_s = 400$  Hz a hodnoty průměrování řádků na 1, jsme získali rychlost skenování 5,78 snímků za sekundu. Před spuštěním snímání obrázků byly sepnuty elektrické impulzy o délce 5 s. Po nasnímání dostatečného množství obrazů byly pulzy vypnuty a snímání pokračovalo do konce snímání bez stimulace. Pro barvení buněčného roztoku bylo použito 5  $\mu$ l napětově citlivého barviva Di-4-ANNEPS (Obr.22) a 10  $\mu$ l fluorescenčního barviva RH237 (Obr.23). U prvního obrázku si opět můžeme povšimnout klesající tendence signálu. Navíc dochází k výraznému poklesu intenzity ve 20 s, kdy byly vypnuty stimulační impulzy. Avšak buňka s navázaným RH237 barvivem má tento pokles v intenzitě přesně opačný, což znamená, že by ke změně fluorescence docházelo v případě nestimulace elektrickými impulzy. Vzhledem k tomu, že používáme fluorescenční barviva závislá na změně napětí, tato změna není možná.

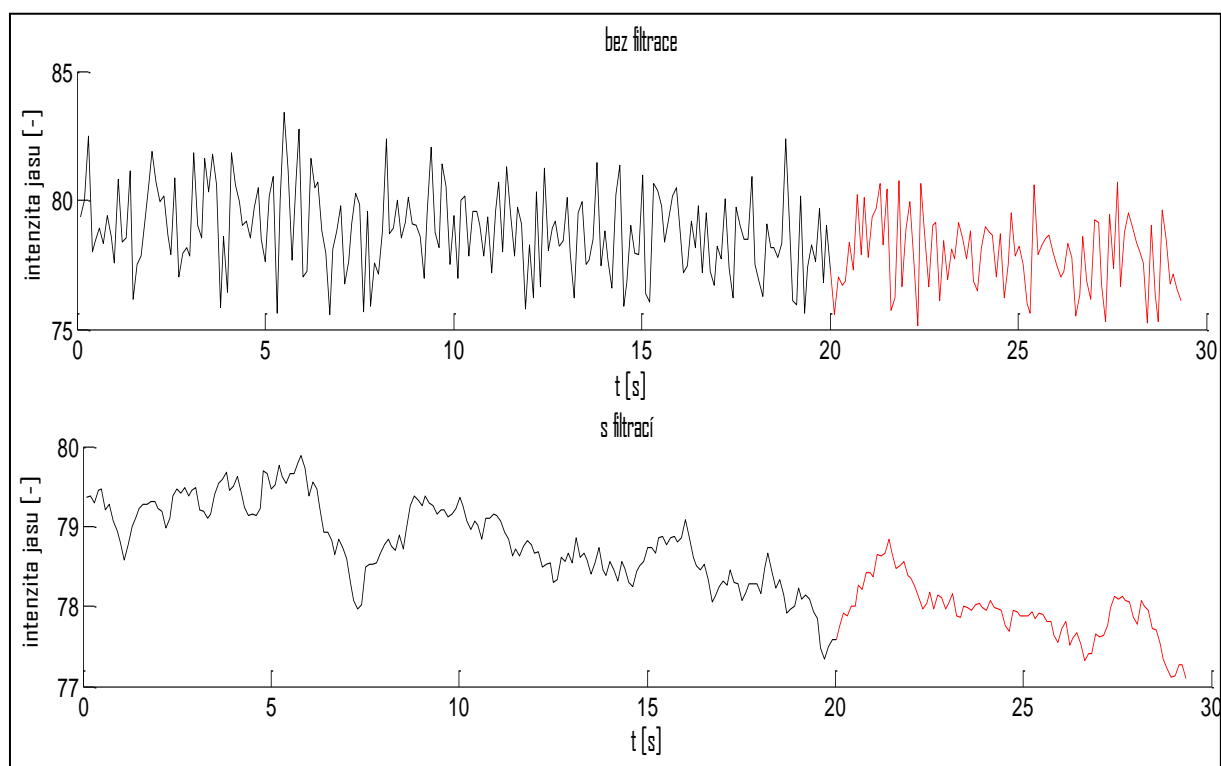


Obrázek 22: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS. Formát 64x64,  $f_s = 400$  Hz, rychlost skenování 5.78 snímků za sekundu, délka impulzu 5 s, počet průměrování řádků 1. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu)



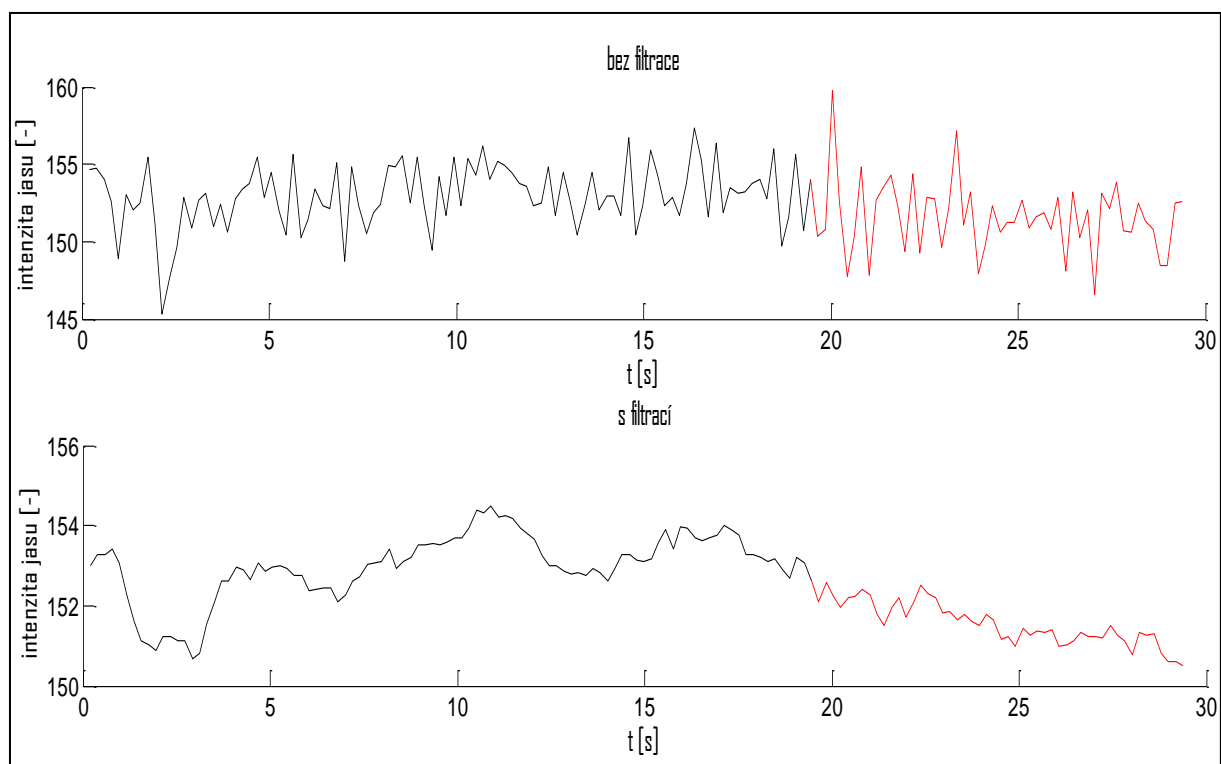
Obrázek 23: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 64x64,  $f_s = 400$  Hz, rychlost skenování 5.78 snímků za sekundu, délka impulzu 5 s, počet průměrování řádků 1. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu)

Nastavením formátu (128x128),  $f_s = 700$  Hz, hodnoty průměrování řádků na 1 a navolením obousměrného skenování, jsme získali rychlost skenování 9,99 snímků za sekundu pro sekvenci obrázků s fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS (použité množství 5  $\mu$ l) (Obr.24). Pro buněčný vzorek s fluorescenčním barvivem RH237 (použité množství 10  $\mu$ l) byly nastaveny tytéž parametry, ale byla zrušena volba obousměrného skenování snímků (Obr.25). Rychlost snímání obrázků byla 5,14 snímků za sekundu. Před spuštěním snímání obrázků byly sepnuty elektrické impulzy o délce 5 s. Po nasnímání dostatečného množství obrazů byly stimulační impulzy vypnuty a snímání pokračovalo do konce bez stimulace. S vyšším formátem bychom měli dostat také vyšší kvalitu snímků. U prvního obrázku s barvivem Di-4-ANNEPS po vyfiltrování si opět můžeme všimnout klesající úrovně intenzity snímků. Protože jsou použity vyšší frekvence snímání, jsou signály obrazů opět hodně zatíženy šumem.



**Obrázek 24:** Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS. Formát 128x128,  $f_s = 700$  Hz, rychlost skenování 9.99 snímků za sekundu, délka impulzu 5 s, počet průměrování řádků 1, obousměrné skenování. Pro filtraci použitá délka okna 7. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – doba bez impulzu)





Obrázek 25: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 128x128,  $f_s = 700$  Hz, rychlost skenování 5.14 snímků za sekundu, délka impulzu 5 s, počet průměrování řádků 1. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – doba bez impulzu)

## 6.5 Změna napětí na membráně buňky výměnou externího fyziologického roztoku

Další metodou pro změnu elektrického napětí na membráně byla zvolena metoda, založená na výměně externího fyziologického roztoku v okolí buňky. Externí fyziologický roztok je roztok, jehož složení je velmi podobné složení roztoku vyplňujícího samotný mezibuněčný prostor a to především co do koncentrace přítomných iontů.

Pro měření bylo potřeba připravit základní a upravený tyrod (externí fyziologický roztok) o předem daném složení chemikálií (Tab.4). Základní externí fyziologický roztok slouží jako medium pro buňky (myší fibroblasty) nabarvené fluorescenčním barvivem. Postup přípravy vzorku pro mikroskopování je shodný s postupem pro měření za pomoci elektrodového systému. V baňce jsme odměřili 1 litr deionizované vody a přidali jsme do ní předem navážené množství chemikálií. Poté bylo potřeba zkalibrovat pH-metr. Ke kalibraci byly použity pufrы 7,00 pH, 4,00 pH a 10,00 pH. Do výsledného roztoku jsme postupně přidávali 1ml 3M NaOH dokud jsme nedosáhli hodnoty pH = 7,4. Tuto hodnotu jsme nesměli přesáhnout. CaCl<sub>2</sub> a glukóza se do výsledného roztoku přidávají až před samotným měřením, kdy jsme v 50 ml externího roztoku rozpustili 0,0049 g CaCl<sub>2</sub> a 0,1 g glukózy.

Stejný postup byl proveden i pro upravený externí fyziologický roztok, ale s rozdílným množstvím NaCl a KCl. Bylo zaměněno 100mM NaCl za ekvimolární množství KCl. Tento roztok je pomalu přečerpáván pomocí peristaltické pumpy. Odlišné složení iontů tohoto roztoku způsobuje změny napětí na buněčné membráně, které jsou pak detekovatelné konfokálním mikroskopem.

Tabulka 4: Přehled použitých sloučenin při přípravě externího roztoku [32]

| Sloučeniny                       | Molární hmotnost [g/mol] | Množství základního tyrodu [g/1l] | Množství upraveného tyrodu [g/1l] |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| NaCl                             | 58,44                    | 7,8894                            | 5,8440                            |
| KCl                              | 74,55                    | 0,4020                            | 7,4556                            |
| MgCl <sub>2</sub>                | 203,30                   | 0,1830                            | 0,1830                            |
| HEPES                            | 238,30                   | 2,3830                            | 2,3830                            |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 156,01                   | 0,0515                            | 0,0515                            |
| CaCl <sub>2</sub>                | 110,98                   | 0,0998                            | 0,0998                            |
| Glukóza                          | 180,15                   | 2,000                             | 2,000                             |

Pro měření bylo potřeba zprovoznit peristaltickou pumpu Rainin Dynamax RP-1(Obr.25). Tato pumpa je tvořena z otočné hlavy, která nese deset válečků. Součástí je pár silikonových trubiček, které jsou v kontaktu s válečky hlavy. Při otáčení hlavy pumpy vždy pět válečků tlačí na trubičku, to zaručuje malou pulsaci, hladký tok a vysoký tlak a přísun velmi malého množství kapaliny k měřenému vzorku. Na ovládacím panelu peristaltické pumpy si můžeme nastavit počet otáček za minutu, v našem experiment bylo použito 5 otáček/minutu. Pro experiment bylo potřeba jeden konec trubičky ponořit do láhve s externím upraveným roztokem a druhou vést k misce s buněčným vzorkem pod konfokálním mikroskopem. Druhý pár trubiček odváděl přebytečný roztok z misky s buněčným roztokem do odpadové láhve. Přečerpávání tak zajišťovalo pomalý a kontinuální průběh výměny roztoku v okolí buňky. Různé iontové složení externího roztoku způsobovalo změny potenciálu na membráně buňky.

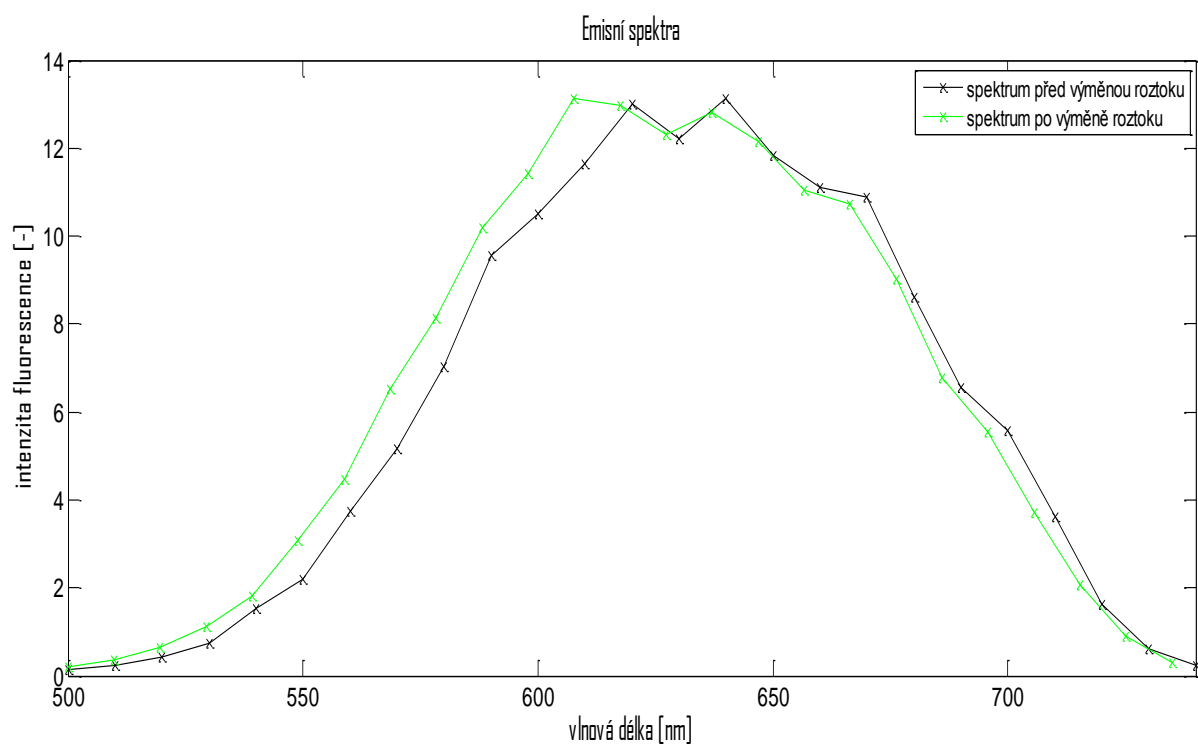


Obrázek 26: Použitá peristaltická pumpa Rainin Dynamax RP-1

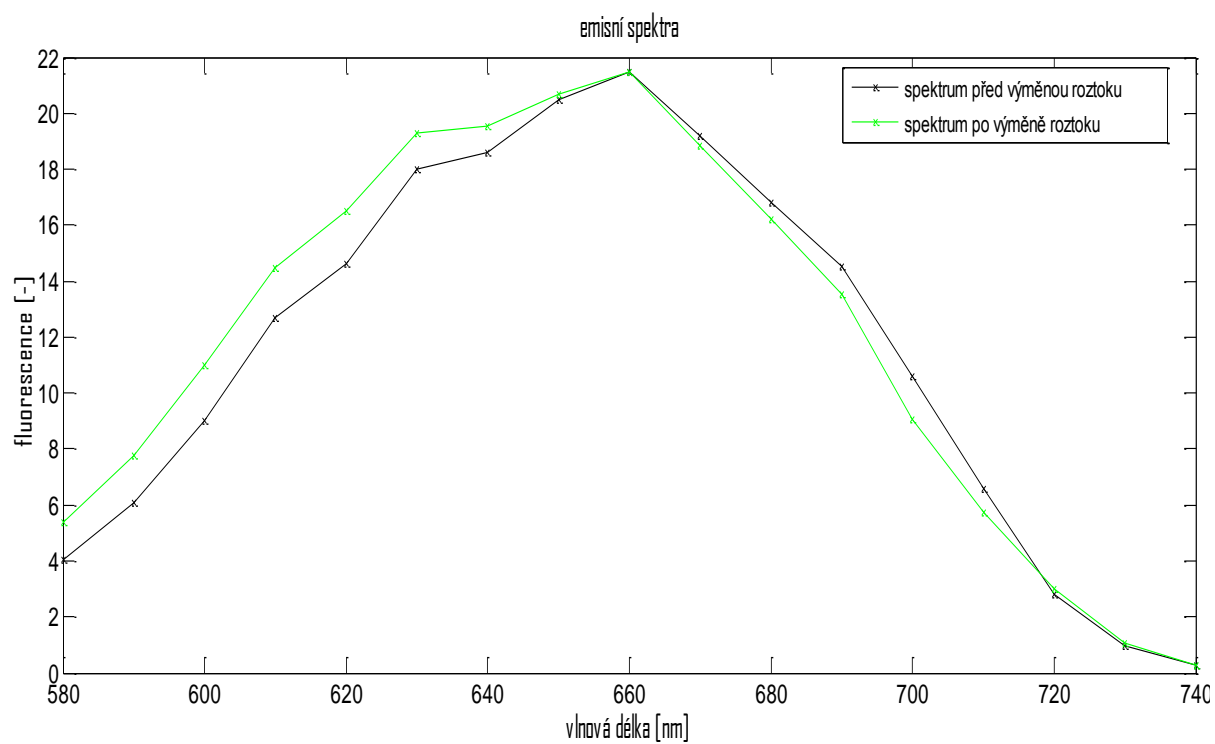
Po řádné přípravě základního a upraveného externího roztoku jsme si mohli vyzkoušet účinnost roztoků na polaritu membrány buňky. V programovém prostředí konfokálního mikroskopu jsme si navolili excitační vlnovou délku laseru. Toto prostředí umožňuje měření emisního spektra vzorku. Před snímáním spektra bylo nastaveno rozlišení formátu na 1024x1024, vzorkovací frekvence na 200 Hz. Pro barvení buněčného roztoku bylo použito 5  $\mu$ l napětově citlivého barviva Di-4-ANNEPS (Obr.16). Měření bylo provedeno, také s použitým napětovým barvivem RH237 (10  $\mu$ l) (Obr.17). jako excitační zdroj záření byl použit laser, pro Di-4-ANNEPS byla použita excitační vlnová délka  $\lambda = 480\text{nm}$ , a pro RH237 excitační vlnová délka  $\lambda = 530\text{nm}$ . Samotné přečerpávání roztoku za pomoci peristaltické pumpy trvalo po dobu 7,5 minuty. Během této doby se roztoky v okolí buňky pomalu přečerpávaly. Rychlost přečerpávání byla nastavena na 5 ml/min. Emisní spektra byla pořízena před výměnou a po výměně upraveného roztoku. Záměnou roztoků dochází k iontové změně externího roztoku a vzniká tak elektrické pole, které ovlivňuje membránu buňky. Navázána napětově citlivá barviva, reagují na tyto změny změnou intenzity fluorescence. Tato změna by měla být viditelná na jednotlivých emisních spektrech, které byly pořízeny.

Pokud došlo ke vzniku elektrického pole v okolí buňky, tato změna by se měla projevit posunem emisního spektra. V ideálním případě by mělo dojít pouze ke spektrálnímu posunu bez změny tvaru a amplitudy spektra. Největší změny intenzity fluorescence jsou registrovány v pravé a levé části spektra, v literatuře se setkáme s názvem blue shift a red shift. Strmé části spektra jsou vhodné k měření k relativní změně fluorescence  $\Delta F / F_{\text{max}}$ . Největší změny intenzity fluorescence jsou registrovány v pravé a levé části spektra, v literatuře se setkáme s názvem blue shift a red shift. Nejrychlejší barviva vykazují relativní změny až 10%/100 mV. Tedy na změnu potenciálu o 100 mV bude barvivo reagovat až 10% změnou intenzity fluorescence.

[17][27]



Obrázek 27: Graf emisních spekter pro barvivo Di-4-ANNEPS. Formát 1024x1024, fs = 200Hz.



Obrázek 28: Graf emisních spekter pro barvivo RH237. Formát 1024x1024, fs = 200Hz.

## 7 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na seznámení se s teorií pojednávající o metodě měření změny membránového napětí na dostupných volných buňkách. Tato metoda využívá fluorescenční barviva s rychlou odezvou na změnu membránového napětí di-4-ANEPPS a RH237. Pro vyvolání změn potenciálu na buňce byl použit elektrodový systém, který byl připojen ke generátoru pulzů. Tento generátor byl součástí konfokálního mikroskopu. Měření byla prováděna na buňkách fibroblastů.

Samotné měření na konfokálním mikroskopu bylo zjednodušeno programovým prostředím, které je součástí tohoto mikroskopu. Zde jsme si mohli libovolně nastavovat parametry vhodné pro snímání obrázků připraveného preparátu. Pro měření byly zrealizovány a následně použity dvě metody. První použitá metoda, využívá k měření elektrody, které by měly v okolí buňky vytvářet elektrické pole a stimulovat měřené vzorky. Druhá metoda se zabývá posunem spektra, jako odpovědi na změnu membránového napětí s použitím externích fyziologických roztoků. Výsledné obrazy intenzit emisního záření byly zpracovávány v programovém prostředí MATLAB.

Přímé srovnání obou barviv je obtížně realizovatelné, i když využíváme systém se stejným nastavením rozlišení, snímkovou frekvenci a dalších akvizičních parametrů. Ukázalo se, že buňky fibroblastů jsou pohledem detekovatelné na monitoru počítače při množství 2,5  $\mu$ l barviva Di-4-ANNEPS, ale barvivo RH237 až při množství větších než 5  $\mu$ l. Zřejmě je to dáno tím, že Di-4-ANNEPS se lépe vázalo na membránu buňky. Navázání barviva na membránu bylo ovlivněno také samotným stářím a kvalitou buněk. Pokud byla membrána buňky poškozena, barvivo se mohlo navázat také na struktury uvnitř buňky, takto navázané barvivo mohlo přispívat k výslednému šumu signálu. K poškození mohlo dojít už při samotném převozu buněk z Univerzitního Campusu Masarykovy univerzity, kdy jsou buňky vystaveny nevhodným podmínkám. Nevýhodou je také skutečnost, že nedochází k rovnoměrné distribuci barviva na membráně. Centrifugací můžeme odstranit nenavázané barvivo v okolí buňky a zlepšit tak poměr signálu k šumu.

Protože snímáme signály, které jsou světelného původu a mají poměrně nízkou intenzitu, jsou jejich výsledné vlastnosti ovlivněny šumem. Mezi zdroje šumu můžeme zařadit šum světelného zdroje, detektorů (např. tepelný šum) a samotné optiky mikroskopu. Kvantizační šum, který vzniká při analogově číslicovém převodu.

Vliv má elektromagnetické pole jiných přístrojů a mikroskopů v místnosti. Další původci šumů se můžou vyskytovat přímo v laboratořích, kde dochází k měřením, jako např. intenzita světla uvnitř místnosti, odlesky ostatních přístrojů. Jako šum se mohou jevit nečistoty, které se dostanou do vzorku při nepřesné manipulaci. Na šumu se z velké míry podílejí pohybové artefakty osob manipulujících se vzorky a provádějících měření na přístrojích a pohyby samotné buňky v roztoku. Plovoucím pohybem buňky v roztoku dochází k tomu, že v průběhu snímání se zobrazuje jas intenzity v různých úrovních hloubky zaostření buněčné membrány. Abychom zamezili projevu pohybových vibrací, je potřeba konfokální mikroskop uložit na odvzdušněném stole.

## 8 Použitá literatura

- [1] ŠIMURDA, J. Bioelektrické jevy. Brno, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT Brno. 2007. p. 1 - 72.
- [2] SHINITZKY, M.: Membrane fluidity and receptor function. In: Membrane Fluidity (M. Kates, L.A. Manson, Plenum Publ. Corp., pp. 585-601, 1984.
- [3] GANONG, W.F. Přehled lékařské fyziologie. Nakl. a vyd. H&H, 1995.
- [4] JIRÁK, R. Úvod do psychologické psychiatrie. Membrána buňky. 2009 [cit. 2012-12-5]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/bp/default.html>
- [5] Filip S., Mokřý J., Hruška I.: Kmenové buňky. Praha, Galén, 2006, p. 223, ISBN 80- 7262-401-6
- [6] HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F.: A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve. J. Physiol., 1952, vol. 117, s. 500-544.
- [7] Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second Edition. New York : Kluwer Academic / Plenum Publ., 1999. 0-306-46093-9.
- [8] Basic Concepts in Fluorescence. Microscopy resource centre [online]. 2012 [cit. 2012-12-5]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [9] Introduction to Fluorescence. Products & Services | Life Technologies [online]. 2012 [cit. 2012-12-1] Dostupné z: <http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/1Intro/player.html>
- [10] Fluorecence Microscope. Microscopy resource centre [online]. 2012 [cit. 2012-12-4]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy.html>
- [11] FIŠAR, Z. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. 2003 [cit. 2012-12-5]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorescence.html>
- [12] Mikroskop-mikroskopy [online]. 2008-2011 [cit. 2012-12-5]. Fluorescence. Dostupné z WWW: <<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence/>>.
- [13] Fluorescence Microscopy [online]. 2003 [cit. 2012-12-9] Dostupné z WWW: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e03/03b.htm>
- [14] Introduction to Potenciometric Probes. Products & Services | Life Technologies [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular Probes The Handbook/Probes-for-Membrane-Potential/Introduction-to-Potentiometric-Probes.html>
- [15] Slow-Response Probes. Products & Services | Life Technologies [online]. 2012 [cit. 2012-12-5]. Dostupné z: <https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Membrane-Potential/Slow-Response-Probes.html>
- [16] VOGELSANG, J, T CORDES, C FORTHMANN, C STEINHAEUER and P TINNEFELD. 2010. Intrinsically resolution enhancing probes for confocal microscopy. Nano Letters [online]. roč.



- 10, č. 2, s. 672–679. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-76749128978&partnerID=40&md5=a022c4d28b102351c6420d502d07a044>
- [17] Fast-Response Probes. Products & Services | Life Technologies [online]. 2012 [cit. 2012-12-5]. Dostupné z: <https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Membrane-Potential/Fast-Response-Probes.html>
- [18] HOPPE, A D, S SEVEAU and J A SWANSON. 2009. Live cell fluorescence microscopy to study microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology* [online]. roč. 11, č. 4, s. 540–550. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-62149133877&partnerID=40&md5=d4e4fe5491d6cd88f735778c6f81442c>
- [19] TAI, D.C.-S., B J CALDWELL, I J LEGRICE, D A HOOKS, A J PULLAN and B H SMAILL. 2004. Correction of motion artifact in transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* [online]. roč. 287, č. 3 56-3, s. H985–H993. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-4143058041&partnerID=40&md5=653af925702c1832b3fe2f9599c0f600>
- [20] Di-4-ANEPPS Products & Services | Life Technologies [online]. 2012 [cit. 2012-12-8]. Dostupné z: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/D1199>
- [21] MATSON, M, N CARLSSON, T BEKE-SOMFAI and B NORDÉN. 2012. Spectral properties and orientation of voltage-sensitive dyes in lipid membranes. *Langmuir* [online]. roč. 28, č. 29, s. 10808–10817. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84864358265&partnerID=40&md5=f34c1ff9dbc5b84c4ebd19d0117fc30e>
- [22] NOVÁKOVÁ, M, K NOGOVÁ, J BARDONOVÁ and I PROVAZNÍK. 2008. Comparison of two procedures of loading with voltage-sensitive Dye Di-4 ANEPPS in rabbit isolated heart. In: *Computers in Cardiology* [online]. S.l.: s.n., s. 1081–1084. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-62249167327&partnerID=40&md5=cea3e29acf649e2c17efaec66579b9d4>
- [23] POPP, A K, C J HYATT, S F MIRONOV, D A WEITZ and A M PERTSOV. 2004. Voltage-sensitive fluorescence imaging on the heart surface. In: *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* [online]. S.l.: s.n., s. 5–12. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-7644241029&partnerID=40&md5=7375efdcccb18978f1b82c189beaa297>
- [24] TOMINAGA, T, Y TOMINAGA, H YAMADA, G MATSUMOTO and M ICHIKAWA. 2000. Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. roč. 102, č. 1, s. 11–23. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034668168&partnerID=40&md5=92b42d11558d06ba7a0aad45a3f16314>
- [25] RH Dyes. Products & Services | Life Technologies [online]. 2012 [cit. 2012-12-4]. Dostupné z: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/D1199>
- [26] NYGREN, A.; KONDO, C.; CLARK, R.B.; GILES, W.R. Voltage-sensitive dye mapping in the Langendorffperfused rat heart. In *American journal of physiology, Hearted and circulatory physiology*, 2003, vol. 284, iss.3, p. H892-H902, ISBN 0363-6135.
- [27] WANG, J, Z.-X. ZHANG, Z.-H. XU, Y.-S. JIN, X.-L. JI and Y.-B. JIN. 2008. An optical mapping system based on spectral shift of voltage-sensitive dyes. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen*

- Xi/Spectroscopy and Spectral Analysis [online]. roč. 28, č. 3, s. 617–620. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-42949169471&partnerID=40&md5=1b84ad49894ef654b6d59d5f0b1d7138>
- [28] XU, Z.-H., Z.-X. ZHANG, J WANG and H ZHANG. 2008. Spectral characteristics of voltage sensitive dye di-4-ANEPPS in perfusates. *Guangzi Xuebao/Acta Photonica Sinica* [online]. roč. 37, č. 3, s. 552–554. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-43249085038&partnerID=40&md5=f23e118642f376a74e806176aad14ab6>
- [29] XU, Z.-H., Z.-X. ZHANG, J WANG, H ZHANG, Z LI, Y.-S. JIN and H.-Y. DING. 2007. Spectral study of voltage sensitive dye di-4-ANEPPS. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectroscopy and Spectral Analysis* [online]. roč. 27, č. 7, s. 1359–1362. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34547742166&partnerID=40&md5=13ab6f027aae64dc95b45543aa7e6bce>
- [30] MATSON, M, N CARLSSON, T BEKE-SOMFAI and B NORDÉN. 2012. Spectral properties and orientation of voltage-sensitive dyes in lipid membranes. *Langmuir* [online]. roč. 28, č. 29, s. 10808–10817. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84864358265&partnerID=40&md5=f34c1ff9dbc5b84c4ebd19d0117fc30e>
- [31] Measuring the Induced Membrane Voltage with Di-8-ANEPPS. *Jove* [online]. 2012 [cit. 2012-12-8]. <http://www.jove.com/video/1659/measuring-the-induced-membrane-voltage-with-di-8-anepps>
- [32] EARLE, Wilton R. Production of Malignancy in Vitro: The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells. Oxford: Oxford Journals, 2012, s. 165-212. ISSN 1460-2105 EARLE, By Wilton R, Thomas H STARK, Nancy P STRAUS, Mary F BROWN and Emma SHELTON. b.r. Production of Malignancy in Vitro . IV . The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells. S.l.: s.n

## 9 Seznam obrázků

|   |    |
|---|----|
| Obrázek 1: Model buněčné membrány. [6] .....  | 4  |
| Obrázek 2: Jablonského diagram. Zářivé a nezářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy molekuly. [8] .....  | 8  |
| Obrázek 3: Stokesův posuv.[10] .....  | 9  |
| Obrázek 4: Princip konfokálního mikroskopu. ....  | 12 |
| Obrázek 5: Konfokální mikroskop. ....   | 12 |
| Obrázek 6: Princip fluorescenčních barviv s rychlou a pomalou odezvou na napěťový stimul. ....  | 16 |
| Obrázek 7: Chemická struktura fluorescenčního barviva Di-4-ANNEPS. ....   | 18 |
| Obrázek 8: Chemická struktura fluorescenčního barviva RH237. ....   | 19 |
| Obrázek 9: Modelový příklad fluorescence excitačního a emisního spektra Di-4-ANNEPS. Fluorescence měřena na roztoku plazmatických bílkovin s použitým fosfátovým pufrem. ....   | 20 |
| Obrázek 10: Buňka po vložení do elektrického pole. ....   | 21 |
| Obrázek 11: Schwanova rovnice.[31] .....  | 22 |
| Obrázek 12: Softwarové prostředí konfokálního mikroskopu. ....  | 24 |
| Obrázek 13: Buňka fibroblastu barvená Di-4-ANNEPS snímána konfokálním mikroskopem. Zvětšení mikroskopu 64x. ....  | 25 |
| Obrázek 14: Buňka fibroblastu barvená RH237 snímána konfokálním mikroskopem. Zvětšení mikroskopu 64x. ....  | 26 |
| Obrázek 15: Navržený elektrodový systém. ....   | 27 |
| Obrázek 16: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS . Formát 64x16, $f_s = 400$ Hz, rychlost skenování 6.54 snímků za sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 3. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu) .....  | 29 |
| Obrázek 17: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 64x16, $f_s = 400$ Hz, rychlost skenování 6.54 snímků za sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu) .....         | 30 |
| Obrázek 18: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS. Formát 64x16, $f_s = 1800$ Hz, rychlost skenování 21.81 snímků za sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu) ..... | 31 |
| Obrázek 19: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 64x16, $f_s = 1800$ Hz, rychlost skenování 21.81 snímků za sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 11. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu) .....      | 31 |
| Obrázek 20: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS. Formát 64x16, $f_s = 1800$ Hz, rychlost skenování 8.36 snímků za  |    |

|   |    |
|---|----|
| sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 9. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu) .....   | 32 |
| Obrázek 21: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 64x64, fs= 1800 Hz, rychlost skenování 8.36 snímků za sekundu, délka impulzu 2 s, počet průměrování řádků 3. Pro filtraci použitá délka okna 9. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu) .....                                  | 33 |
| Obrázek 22: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS. Formát 64x64, fs= 400 Hz, rychlost skenování 5.78 snímků za sekundu, délka impulzu 5 s, počet průměrování řádků 1. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu) .....                             | 34 |
| Obrázek 23: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 64x64, fs= 400 Hz, rychlost skenování 5.78 snímků za sekundu, délka impulzu 5 s, počet průměrování řádků 1. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – bez impulzu) .....                                   | 34 |
| Obrázek 24: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem Di-4-ANNEPS. Formát 128x128, fs= 700 Hz, rychlost skenování 9.99 snímků za sekundu, délka impulzu 5 s, počet průměrování řádků 1, obousměrné skenování. Pro filtraci použitá délka okna 7. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – doba bez impulzu)..... | 35 |
| Obrázek 25: Graf intenzit jasu membrány pro sekvenci snímků s použitým fluorescenčním barvivem RH237. Formát 128x128, fs= 700 Hz, rychlost skenování 5.14 snímků za sekundu, délka impulzu 5 s, počet průměrování řádků 1. Pro filtraci použitá délka okna 5. (černá – doba trvání elektrického impulzu, červená – doba bez impulzu) .....                            | 36 |
| Obrázek 26: Použitá peristaltická pumpa Rainin Dynamax RP-1 .....   | 38 |
| Obrázek 27: Graf emisních spekter pro barvivo Di-4-ANNEPS. Formát 1024x1024, fs = 200Hz. ....   | 40 |
| Obrázek 28: Graf emisních spekter pro barvivo RH237. Formát 1024x1024, fs = 200Hz. ....   | 40 |

## 10 Seznam tabulek

|  |    |
|--|----|
| Tabulka 1: Přehled napětově citlivých fluorescenčních barviv .....               | 17 |
| Tabulka 2: Přehled použitého materiálu .....                                     | 23 |
| Tabulka 3: Přehled daných měření.....  | 28 |
| Tabulka 4: Přehled použitých sloučenin při přípravě externího roztoku [32] ..... | 37 |